

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA MAZETTO DE CARVALHO

**OXIDAÇÃO VIA PERIODATO/CLORITO DE ULVANAS DE *ULVA FASCIATA*:
ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

CURITIBA

2017

MARIANA MAZETTO DE CARVALHO

**OXIDAÇÃO VIA PERIODATO/CLORITO DE ULVANAS DE *ULVA FASCIATA*:
ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutora em Ciências-
Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia
Duarte Nosedá

Coorientadores: Prof. Dr. Miguel Daniel
Nosedá e Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Carvalho, Mariana Mazetto de

Oxidação via periodato/clorito de ulvanas de *Ulva fasciata*: atividade anticoagulante e propriedades físico-químicas. / Mariana Mazetto de Carvalho. – Curitiba, 2017.

177f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria Eugênia Duarte Nosedá

Co-orientador: Miguel Daniel Nosedá

Co-orientador: Rilton Alves de Freitas

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Oxidação. 2. Ulva. 3. Macroalga. 4. Anticoagulantes. I. Título II. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. III. Nosedá, Miguel Daniel. IV. Freitas, Rilton Alves de. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.19258



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **MARIANA MAZETTO DE CARVALHO**, intitulada: "**OXIDAÇÃO VIA PERIODATO/CLORITO DE ULVANAS DE ULVA FASCIATA: ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Novembro de 2017.

MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ALAN GUILHERME GONÇALVES
Avaliador Externo (UFPR)

ALEXANDRE ORSATO
Avaliador Externo (UEL)

CARMEN LUCIA DE OLIVEIRA PETKOWICZ
Avaliador Interno (UFPR)

RODRIGO VASSOLER SERRATO
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá, pela dedicada orientação, pelo apoio e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Miguel D. Nosedá, pelas contribuições e ensinamentos ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, pelos ensinamentos referentes às propriedades físico-químicas, pelas contribuições e pela disponibilidade e paciência.

Aos professores da banca interna: Prof. Dr. Alan G. Gonçalves e Profa. Dra. Joana L. M. Silveira, pelas correções e sugestões para este trabalho.

À banca examinadora composta pelos professores: Dr. Alan G. Gonçalves, Dr. Alexandre Orsato, Dra. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz e Dr. Rodrigo Vassoler Serrato, pelas observações e sugestões ao trabalho durante a arguição.

Ao professor Prof. Dr. Diogo R.B. Ducatti por toda ajuda e pelas sugestões.

À técnica Elisângela pelas análises de HPSEC-RI-MALLS, bem como aos colegas que auxiliaram nestas análises: Dr. Cassiano C. Silva e Dra. Pauline L. Nasato.

À técnica Rosane, pelas análises de GC-MS.

Ao Centro de RMN- UFPR pelas análises de RMN.

Ao CETFAR (Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaio Farmacêuticos) da Universidade Federal de Santa Maria, pela doação do plasma utilizado nos testes anticoagulantes.

Aos colegas de laboratório E3 e 248 por toda ajuda, troca de ideias e amizade: Pauline, Luciana, Cassiano, Cláudia, Franciely, Lucas, Ester, André, Michelle, Jaqueline, Amanda, Daniel, Rafael, Mieko, Jenifer, Bárbara, Diego e todos os demais colegas que passaram por estes laboratórios ao longo do mestrado e doutorado.

À Dra. Luciana G. Ferreira e à Dra. Franciely G. Colodi pela amizade, por todo o apoio e carinho e pelas discussões de resultados, trocas de ideias e sugestões.

Aos colegas dos laboratórios 269 e 308.

À doutoranda Gislaíne Santos, pela ajuda na atividade anticoagulante.

À doutoranda Jaqueline Carneiro, pelas análises de FTIR.

Aos colegas do laboratório BIOPOL: Andressa, Cleverton, Joslaíne, Helen, Renata, Carol, João, Larissa, Guilherme. Obrigada por receberem bem no laboratório, por me auxiliarem no manuseio dos equipamentos e pelas sugestões dadas durante as reuniões.

À CAPES pela oportunidade de bolsa. Às demais agências de fomento e projetos que financiaram este trabalho: CNPQ, Fundação Araucária e Projeto Universal.

Aos meus pais pelo incentivo. À minha irmã por todo carinho. Ao Gabriel, pelo companheirismo e pelo incentivo ao longo dos anos do doutorado. Aos demais familiares e amigos.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção e a caracterização de ulvanas policarboxílicas via oxidação periodato-clorito e avaliação da atividade anticoagulante e propriedades físico-químicas dos polímeros nativos e modificados quimicamente. A macroalga verde *Ulva fasciata* foi submetida à extração aquosa (80 °C, 4 h) originando as ulvanas nativas F2 (20,6% de sulfato, 0,36 mmol.g⁻¹ de COOH). Análises químicas e espectroscópicas (RMN e FTIR) mostraram que F2 é constituída por díades 4-ligadas de α-L-ramnose 3-sulfato ligada à unidade de ácido urônico (β-D-glucurônico ou α-L-idurônico) ou à unidade de β-D-xilose sulfatada ou não em C-2. F2 foi oxidada com NaIO₄ por 24, 48 e 72 horas e sequencialmente com NaClO₂ originando as frações C1, C2 e C3, respectivamente (COOH = 1,23-1,81 mmol.g⁻¹). C3 foi fracionada em DEAE-Sephacel originando a fração de maior rendimento C3c (25% de sulfato e 2,10 mmol.g⁻¹ de COOH). As ulvanas nativas e modificadas foram analisadas por HPSEC-RI-LS. Após a modificação química houve redução nos valores de Massa Molar Média Ponderada (M_w) em até 6,9 vezes e diminuição no tamanho dos segmentos rígidos (comprimento de persistência – L_p) em até 2,6 vezes. A avaliação da atividade anticoagulante *in vitro* através do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) mostrou que as ulvanas policarboxílicas apresentaram atividade anticoagulante superior em relação a fração nativa na seguinte ordem: C1<C2<C3c<C3. As ulvanas nativas apresentaram uma baixa variação nos tempos de protrombina (PT) e trombina (TT) em relação à salina, sugerindo que as ulvanas policarboxílicas atuam na via intrínseca da cascata de coagulação. Esta atividade foi atribuída a um balanço de cargas negativas (grupo sulfato e carboxila) no qual o polímero adote uma conformação ao acaso em solução. Desse modo, a modificação química das ulvanas via oxidação periodato-clorito originou diferentes ulvanas policarboxílicas com potencial aplicação como novos anticoagulantes.

Palavras-chaves: Ulvanas, modificações químicas, oxidação periodato-clorito, atividade anticoagulante.

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain and polycarboxylic ulvans via periodate-chlorite oxidation. The green seaweed *Ulva fasciata* was submitted to aqueous extraction (80 °C, 4 h) in order to obtain fraction F2 (20.6% of sulfate groups and 0.36 mmol.g⁻¹ of COOH). Chemical and spectroscopic analysis (¹³C, ¹H and HSQC NMR) showed F2 is built of α-L-rhamnose 3-sulfate 4-linked to uronic acids (β-D-glucuronic or α-L-iduronic) or β-D-xylose sulfated or not at C-2. F2 was oxidized with NaIO₄ for 24, 48 and 72 h and then oxidizes with NaClO₂ originating fractions C1, C2 and C3 respectively (COOH = 1.23-1.81 mmol.g⁻¹). C3 was fractionated in DEAE-Sephacel giving rise to the major fraction C3c (25% of sulfate and 2.1 mmol.g⁻¹ of COOH). The modified ulvans were analyzed by HPSEC-RI-LS. After chemical modification the Molar Mass (Mw) and the size of rigid segments decreased until 6.9 and 2.6 fold, respectively. The anticoagulant activity of native and polycarboxylic ulvans was evaluated by the *in vitro* assay of activated prothrombin time (APTT). The chemical modified products presented a higher anticoagulant activity when compared to native ulvan F2 in the following sequence: C1< C2<C3c<C3. The native and polycarboxylic ulvans induced only a slight increase in time clotting in the assay of prothrombin (PT) and thrombin time (TT), suggesting the anticoagulant activity of polycarboxylic ulvans is mainly due to an interaction of these polymers with the coagulation factors from the intrinsic pathway. The activity was attributed to a distribution of negative charges (sulfate and carboxyl groups) in which the polymer adopt a random coil chain conformation in solution. Therefore, chemical modification of ulvans via periodate/chlorite oxidation originated different polycarboxylic ulvans with potential applications as new anticoagulant drugs.

Keyword: ulvans, chemical modification, periodate-chlorite oxidation, anticoagulant activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DÍADES REPETITIVAS PRESENTES EM ULVANAS	23
FIGURA 2 - UNIDADE REPETITIVA DA CELULOSE E DE SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS	29
FIGURA 3 - MECANISMO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM PERIODATO	32
FIGURA 4 - UNIDADES DE GLUCOSE OXIDADAS COM PERIODATO	33
FIGURA 5 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DE DIOL	34
FIGURA 6 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DE HEMIACETAL	35
FIGURA 7 - FORMAÇÃO DE HEMIACETAIS EM ALGINATO APÓS OXIDAÇÃO COM PERIODATO	35
FIGURA 8 - MECANISMO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM CLORITO EM MEIO ÁCIDO	38
FIGURA 9 – VIA CLÁSSICA DA CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	42
FIGURA 10 - ESTRUTURA DISSACARÍDICA REPETITIVA DA HEPARINA ..	44
FIGURA 11 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA	45
FIGURA 12 - SEQUÊNCIA DISSACARÍDICA REPETITIVA PRESENTE NAS CARRAGENANAS (A) E ESTRUTURA GERAL DAS CARRAGENANAS DA FAMÍLIA <i>KAPPA</i> E <i>LAMBDA</i> (B)	47
FIGURA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE RAO DE GIRO E RAO HIDRODINÂMICO	51
FIGURA 14 - EXEMPLAR DE <i>ULVA FASCIATA DELILE</i>	58
FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>U. FASCIATA</i>	60
FIGURA 16 - MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE ULVANAS DE <i>U. fasciata</i> REALIZADAS NO PRESENTE TRABALHO	61
FIGURA 17 - CARBOXI-REDUÇÃO DE ÁCIDOS URÔNICOS. (A) FORMAÇÃO DE HEXOSE DEUTERADA. (B) FRAGMENTOS DE MASSA (GC-MS)	78
FIGURA 18 - FRAGMENTOS DE MASSA DO DERIVADO 2,3,4-TRI-O-ACETIL-1,6-ANIDRO-IDITOL OBTIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	79
FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA ULVANA NATIVA F2 (A) E CARBOXI-REDUZIDA R (B)	81
FIGURA 20 - ESPECTRO DE HSQC DA ULVANA NATIVA F2 (A e B) E CARBOXI-REDUZIDA R (C e D)	82
FIGURA 21 - EXEMPLO DE UMA DÍADE DE ULVANA PASSÍVEL DE OXIDAÇÃO COM NaIO ₄	85

FIGURA 22 - ESPECTRO DE FTIR DA ULVANA NATIVA F2 (A) E DE SEUS PRODUTOS P1 (B), P2 (C) E P3 (D) OBTIDOS APÓS A OXIDAÇÃO COM PERIODATO	86
FIGURA 23 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) e P3 (D)	92
FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) E P3 (D)	93
FIGURA 25 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C (REGIÃO DE 110-85 PPM) DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) e P3 (D)	94
FIGURA 26 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 110-88 PPM E 5,5-4,5 PPM) DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)	95
FIGURA 27 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 88-55 PPM E 5,0-3,0 PPM) DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)	96
FIGURA 28 - ESPECTRO DE TOCSY DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)	97
FIGURA 29 - ESPECTRO DE COSY DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)	98
FIGURA 30 - ESPECTRO DE FTIR DAS FRAÇÕES R (A) E R-P3 (B)	101
FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES R (A) E R-P3 (B)	104
FIGURA 32 - TRATAMENTO COM NaBH_4 DOS GRUPOS ALDEÍDO DOS DERIVADOS DE ULVANAS OBTIDOS APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO_4	105
FIGURA 33 - ESPECTRO DE FTIR DAS FRAÇÕES P3 (A) E P3-r (B)	105
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES P3 (A) E P3-r (B)	108
FIGURA 35 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P3-r	109
FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN DE COSY (A) e TOCSY (B) DA FRAÇÃO P3-r	110
FIGURA 37 - OXIDAÇÃO COM NaClO_2 DOS GRUPOS ALDEÍDO DOS DERIVADOS ULVANAS OBTIDOS APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO_4	113
FIGURA 38 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (210-60 PPM) DE F2 (A) E F2oxC (B)	115
FIGURA 39 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C (110-60 PPM E 30-10 PPM) DE F2 (A) E F2oxC (B)	116
FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C1 (A), C2 (B) e C3 (C)	122
FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (REGIÃO DE 110-92 PPM) DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS C1 (A), C2 (B) e C3 (C)	123
FIGURA 42- ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO ANOMÉRICA) DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS C1 (A), C2 (B) e C3 (C)	124

FIGURA 43 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 85-65 E 5,0-3,0 PPM) DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS C1 (A), C2 (B) e C3 (C).....	125
FIGURA 44 - ESPECTRO DE HMBC DA FRAÇÃO C3.....	126
FIGURA 45 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DESSULFATAÇÃO DA ULVANA NATIVA F2 (A) E POLICARBOXÍLICA (C3).....	129
FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C3b (A) E C3c (B).....	134
FIGURA 47 - ESPECTRO DE HSQC DAS FRAÇÕES C3b (A) E C3c (B)	135
FIGURA 48 - FRAÇÕES UTILIZADAS NOS TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	137
FIGURA 49 - GRÁFICO DO APTT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLÍMERO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS POLICARBOXÍLICOS (C1, C2, C3, C3b, C3c E R-C3).....	141
FIGURA 50 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO E ESPALHAMENTO DE LUZ DA ULVANA NATIVA F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE	147
FIGURA 51 - CURVA DE TITULAÇÃO DA ULVANA NATIVA F2, DIALDEÍDICA P3 E POLICARBOXÍLICA C3 COM HCl (A), NaCl (B) E CaCl_2 (C e D).....	151
FIGURA 52 - RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES F2-Dw (A) E F2-DwCa (B)	158
FIGURA 53 - RMN DE HSQC DAS FRAÇÕES F2-Dw (A e C) E F2-DwCa (B e D)	159
FIGURA 54 - RMN DE HMBC DA FRAÇÃO F2-DW	160
FIGURA 55 - RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C3-Dw (A) E C3-DwCa (B)	162
FIGURA 56 - RMN DE HSQC DAS FRAÇÕES C3-Dw (A e C) E C3-DwCa (B e D)	163
FIGURA 57- VALORES DE CN2APTT DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS EM FUNÇÃO DO TEOR DE SULFATO, CARBOXILA E M_w	166

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO F2	75
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO F2	76
TABELA 3 - RENDIMENTO, TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA ULVANA NATIVA (F2) E CARBOXI-REDUZIDA (R).....	79
TABELA 4 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) NOS ESPECTROS DE RMN DA ULVANA NATIVA (F2) E CARBOXI-REDUZIDA (R).....	83
TABELA 5 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F2, P1, P2 E P3.....	87
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES P1, P2, P3 E DE SEUS PRODUTOS CARBOXI-REDUZIDOS	89
TABELA 7 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES P1, P2 E P3	99
TABELA 8 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA ULVANA CARBOXI-REDUZIDA R E CARBOXI-REDUZIDA DIALDEÍDICA R-P3	102
TABELA 9 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA ULVANA CARBOXI-REDUZIDA R E CARBOXI-REDUZIDA DIALDEÍDICA R-P3	102
TABELA 10 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES P3 E P3-r	106
TABELA 11 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES P3 E P3-r.....	106
TABELA 12 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DA FRAÇÃO P3-r.....	111
TABELA 13 - RENDIMENTO E TEOR DE GRUPOS CARBOXILA DAS REAÇÕES DE P3 COM CLORITO DE SÓDIO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AGENTE OXIDANTE E TEMPERATURA	114
TABELA 14 - TITULAÇÃO DOS GRUPOS CARBOXÍLICOS PRESENTES NA FRAÇÃO NATIVA E DE SEUS PRODUTOS OXIDADOS	117
TABELA 15 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS ULVANAS DIALDEÍDICAS (P1, P2 E P3) E POLICARBOXÍLICAS (C1, C2 E C3)	118
TABELA 16 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C1, C2 E C3 E DE SEUS PRODUTOS CARBOXI-REDUZIDOS	119
TABELA 17 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS.....	127
TABELA 18 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F2 E C3 E DE SEUS PRODUTOS DESSULFATADOS	129

TABELA 19 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES F2 E C3 E DE SEUS PRODUTOS DESSULFATADOS	130
TABELA 20 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA ULVANA POLICARBOXÍLICA C3 E DE SUAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL.....	131
TABELA 21 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA ULVANA POLICARBOXÍLICA C3 E DE SUAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL.....	132
TABELA 22 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C3c E C3c-R	132
TABELA 23 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS C3b E C3c ..	136
TABELA 24 - TESTE DE APTT DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS	139
TABELA 25 - TESTE DE APTT PARA A HEPARINA	139
TABELA 26 - EQUAÇÃO DA RETA, CN2APTT, E $\Delta T.\mu g^{-1}$ DE POLISSACARÍDEO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS POLICARBOXÍLICOS (C1, C2, C3 C3b, C3c E R-C3)	142
TABELA 27 - TESTE DE PT PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS POLICARBOXÍLICOS (C1, C2 E C3).....	143
TABELA 28 - TESTE DE PT PARA A HEPARINA.....	144
TABELA 29 - TESTE DE TT DA ULVANA NATIVA (F2) E DE SEUS PRODUTOS POLICARBOXÍLICOS (C1, C2 E C3).....	144
TABELA 30 - TESTE DE TT PARA A HEPARINA	145
TABELA 31 - MASSA MOLAR MÉDIA PONDERADA, DISPERSÃO, DN/DC E RECUPERAÇÃO DA COLUNA DE HPSEC DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE	148
TABELA 32 - VISCOCIDADE ÍNTRINSECA ($[\eta]$), RAIO DE GIRO (R_g), α , COMPRIMENTO DE CONTORNO (L) E DE PERSISTÊNCIA (L_p) DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE	149
TABELA 33 - VALORES DE pKa DOS GRUPOS IONIZÁVEIS PRESENTES NAS FRAÇÕES F2, P3 E C3	152

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ΔT – Variação de tempo

\bar{D} – M_w/M_n

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca

APTT - tempo de tromboplastina parcial ativada

CN2APTT - concentração necessária para dobrar o valor normal do APTT

COSY - *correlation spectroscopy*

dn/dc – variação do índice de refração em relação a concentração

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier

GC-MS – Cromatografia gasosa aplicada a espectrometria de massas

HCII - cofator II da heparina

HMBC - *heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy*

HMWK - cininogênio de alta massa molar

HSQC - *heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*

HPSEC – cromatografia de exclusão por tamanho de alto desempenho

L- comprimento de contorno

LMWH – heparina de baixa massa molar

L_p – Comprimento de persistência

MALLS – *multi-angle laser light scattering*

M_n – massa molar média numérica

m/z – relação entre massa e carga

M_w – massa molar média ponderal

n.d. - não detectado

PT– tempo de protrombina

R_g = raio de giro

R_h – raio hidrodinâmico

RI – Índice de refração

RMN - ressonância magnética nuclear

RMN 1H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ^{13}C - ressonância magnética nuclear de carbono treze

rpm – rotações por minuto

TEMPO - *N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina*

TFA - ácido trifluoracético

TFPI - inibidor da via do fator tissular

TOCSY - *total correlation spectroscopy*

TT - tempo de trombina

UFH – (heparina não fracionada)

VIS – viscosímetro

F2 - Ulvana nativa, obtida após a extração aquosa a 80 °C.

D - Fração obtida a partir da dessulfatação de F2.

R - Fração obtida a partir da carboxi-redução de F2.

P1, P2 e P3 - Frações obtidas após a oxidação de F2 com periodato de sódio nos tempos de 24, 48 e 72 h, respectivamente.

P1-R, P2-R e P3-R - Frações obtidas a partir da carboxi-redução de P1, P2 e P3, respectivamente.

R-P3 - Fração obtida a partir da oxidação de R com periodato de sódio.

P3-r - Fração obtida a partir da redução de P3 com NaBH₄.

C1, C2 e C3 - Fração obtida a partir da oxidação de P1, P2 e P3 com clorito de sódio, respectivamente.

C1-R, C2-R e C3-R - Frações obtidas a partir da carboxi-redução de C1, C2 e C3, respectivamente.

F2-oxC - Fração obtida após a oxidação de F2 com clorito de sódio.

C3a, C3b, C3c e C3d – Frações obtidas a partir da eluição de C3 em DEAE-Sephacel com 0; 0,5; 1,0 e 1,5 mol.g⁻¹ de NaCl, respectivamente.

C3-D - Obtida após a dessulfatação de C3.

F2-Dw e C3-Dw - Obtida após o tratamento de F2 e C3 com resina DOWEX.

F2-DwCa e C3-DwCa – Obtida após o tratamento de F2-Dw e C3-Dw com CaCl₂.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE MACROALGAS MARINHAS	20
2.2 POLISSACARÍDEOS BIOSINTETIZADOS POR MACROALGAS VERDES DA ORDEM ULVALES.....	21
2.2.1 Estrutura química de ulvanas	21
2.2.2 Conformação de ulvanas e interação com íons	24
2.2.3 Atividades biológicas de ulvanas	25
2.2.4 Propriedades físico-químicas das ulvanas.....	27
2.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS.....	29
2.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS VIA OXIDAÇÃO COM PERIODATO E CLORITO DE SÓDIO	31
2.4.1 Oxidação de polissacarídeos com periodato	31
2.4.2 Características dos produtos obtidos após a oxidação de polissacarídeos com periodato	35
2.4.4 Características e potenciais aplicações dos produtos obtidos após a oxidação com clorito de derivados dialdeídicos de polissacarídeos	38
2.5 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS VIA OXIDAÇÃO COM PERIODATO E REDUÇÃO COM NaBH ₄	39
2.6 HEMOSTASIA.....	40
2.6.1 Coagulação.....	40
2.6.2 Heparina	43
2.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE MACROALGAS.....	46
2.8 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS	50
2.8.1 Raio de giro e raio hidrodinâmico	50
2.8.2 – Comprimento de persistência	51
3 OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVOS GERAIS	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4 JUSTIFICATIVA	56
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58

5.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS ULVANAS.....	60
5.4.1 Carboxi-redução da fração F2	61
5.4.2 Oxidação com <i>meta</i> -periodato de sódio para a fração F2 e R.....	62
5.4.3 Redução com NaBH ₄ da fração P3	62
5.4.4 Oxidação com clorito em escala analítica	63
5.4.4.1 Efeito da variação do agente oxidante para a reação de oxidação de ulvanas dialdeídicas com NaClO ₂	63
5.4.4.2 Efeito da temperatura do meio reacional para a reação de oxidação de ulvanas dialdeídicas com NaClO ₂	64
5.4.5 Oxidação com clorito das frações P1, P2, P3 e R-P3 em escala preparativa	64
5.4.6 Dessulfatação das frações F2 e C3	65
5.5 FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL DA FRAÇÃO C3.....	65
5.6 CARBOXI-REDUÇÃO DOS PRODUTOS OXIDADOS	66
5.7 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS	66
5.7.1 Carboidratos totais.....	66
5.7.2 Proteínas totais	66
5.7.3 Grupos sulfato	67
5.7.4 Ácidos Urônicos.....	67
5.7.5 Polarimetria.....	67
5.7.6 Dosagem de grupos carboxila por titulação com NaOH	68
5.8 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	68
5.8.1 Hidrólise ácida total, redução e acetilação.....	68
5.9 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-EM).....	69
5.10 ANÁLISE POR INFRATERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	69
5.11 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	70
5.11.1 Técnicas de RMN monodimensionais.....	70
5.11.2 Técnicas de RMN bidimensionais.....	70
5.12 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>in vitro</i>	71
5.12.1 Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT).....	71
5.12.2 Tempo de protrombina (PT).....	71
5.12.3 Tempo de trombina (TT)	72

5.13 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO DE ALTO DESEMPENHO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI), ESPALHAMENTO DE LUZ LASER EM ÂNGULO RETO (90°) E EM ÂNGULO BAIXO (7°) E DETECTOR VISCOSIMÉTRICO (SEC-IR-LS-VIS)	72
5.14 Titulações potenciométricas	73
5.14.1 Titulação com HCl.....	73
5.14.2 Titulação com NaCl.....	73
5.14.3 Titulação com CaCl ₂	73
5.15 TRATAMENTO DE F2 E C3 COM DOWEX E CaCl ₂	74
6 RESULTADOS	75
6.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS ULVANAS NATIVAS	75
6.1.1 Rendimento, análises químicas e composição monossacarídica da ulvana de <i>U. fasciata</i>	75
6.1.2 Carboxi-redução da fração F2	76
6.1.3 ANÁLISES DE RMN DAS FRAÇÕES F2 e R	79
6.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F2 E R	84
6.3. OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO F2 COM META-PERIODATO DE SÓDIO	85
6.3.1 Rendimento, análises químicas e composição monossacarídica das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3	86
6.3.2 Análise por RMN mono- e bidimensionais das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3	90
6.4 OXIDAÇÃO DA ULVANA CARBOXI-REDUZIDA (R) COM META-PERIODATO	100
6.4.1 Rendimento, análises químicas e composição monossacarídica das ulvanas carboxi-reduzidas dialdeídicas R-P3	101
6.4.2 Análise por RMN mono- e bidimensionais das ulvanas carboxi-reduzidas dialdeídicas R-P3.....	103
6.5 TRATAMENTO DA FRAÇÃO P3 COM NaBH ₄	104
6.5.1 Análises químicas e composição monossacarídica das ulvanas dialdeídicas reduzidas P3-r.....	106
6.5.2 Análise de RMN das ulvanas dialdeídicas reduzidas P3-r.....	107
6.6 OXIDAÇÃO COM CLORITO EM ESCALA ANALÍTICA	112
6.7 OXIDAÇÃO DAS ULVANAS NATIVAS F2 COM CLORITO	114
6.7.1 Análises de RMN de ¹³ C da fração F2oxC.....	115
6.8 OXIDAÇÃO DAS ULVANAS DIALDEÍDICAS P1, P2, P3 E R-P3 COM CLORITO EM ESCALA PREPARATIVA.....	117

6.8.1 Análises químicas e composição monossacarídica das ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3.....	118
6.8.2 Análise de RMN de ^{13}C das ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3.....	120
6.9 DESSULFATAÇÃO DA ULVANA NATIVA F2 E POLICARBOXÍLICA C3	128
6.10 FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL DA ULVANA POLICARBOXÍLICA C3	130
6.10.1 Análises químicas e composição monossacarídica das subfrações obtidas após cromatografia de troca iônica da fração C3	130
6.10.2 Carboxi-redução das ulvanas policarboxílicas C3c.....	132
6.10.3. Análises de RMN das ulvanas policarboxílicas C3b e C3c	133
6.11 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS ULVANAS NATIVAS E MODIFICADAS	136
6.11.1 Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) para as ulvanas nativas (F2) e seus produtos modificados via reações de oxidação, dessulfatação e redução.....	137
6.11.2 Teste de tempo de protrombina (PT) para as ulvanas nativas e policarboxílicas	143
6.11.3 Teste de tempo de trombina (TT) para as ulvanas nativas e policarboxílicas	144
6.12 PROPRIEDADES MACROMOLECULARES DAS ULVANAS NATIVAS E DE SEUS PRODUTOS OBTIDOS VIA OXIDAÇÃO PERIODATO-CLORITO	145
6.12.1 Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Alto Desempenho (HPSEC) Acoplada a Detector de Índice de Refração (RI) Diferencial, Espalhamento de Luz em ângulo reto (90°) e em ângulo baixo (7°) e detector viscosimétrico (HPSEC-RI-LS-VIS).....	146
6.13 TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS	150
6.13.1 Titulação das ulvanas nativas e policarboxílicas com HCl.....	151
6.13.2 Titulação das ulvanas nativas e policarboxílicas com NaCl.....	153
6.13.3 Titulação das ulvanas nativas e policarboxílicas com CaCl_2	154
6.13.4 Titulação das ulvanas nativas e policarboxílicas com CaCl_2 na presença de NaCl 0,9%.....	155
6.14 ANÁLISES DE RMN DAS ULVANAS NATIVAS E POLICARBOXÍLICAS PRESENÇA DE CÁLCIO	156
6.14.1 Análises de RMN das frações F2-Dw e F2-DwCa	156
6.14.2 Análises de RMN das frações C3-Dw e C3-DwCa	161
6.15 RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA DAS ULVANAS NATIVAS E POLICARBOXÍLICAS E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	164
REFERÊNCIAS.....	169

1 INTRODUÇÃO

Macroalgas verdes do gênero *Ulva spp.*, comumente associadas com regiões eutrofizadas, biossintetizam polissacarídeos sulfatados denominados ulvanas, os quais apresentam propriedades biológicas e físico-químicas de interesse farmacêutico e biotecnológico (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; TOSKAS *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2015). Destaca-se ainda, que estes polímeros apresentam uma estrutura química única, sendo formados principalmente pelo ácido aldobiurônico sulfatado: $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D}\text{-}\text{ácido glucurônico-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-ramnose 3-sulfato-(1}\rightarrow]$.

Dentre as atividades biológicas, estudos comprovam a atividade anticoagulante das ulvanas (MAO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2013).

O agente anticoagulante usado na clínica médica é a heparina. No entanto, seu uso está relacionado com efeitos adversos, como por exemplo, trombocitopenia, hemorragia, além do risco de contaminação viral devido sua origem animal. Portanto, a busca de novos compostos com atividade anticoagulante é necessária (LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009; MESTECHKINA; SMESTECHKINA, 2010).

Dentro deste contexto, modificações químicas podem ser utilizadas com o objetivo de potencializar as propriedades anticoagulantes apresentadas por ulvanas, além de permitir identificar as subestruturas chaves necessárias para cada atividade.

A atividade anticoagulante de polissacarídeos depende da massa molar e da presença de grupos sulfato em posições específicas, a qual pode variar de acordo com o tipo de polissacarídeo. (POMIN; MOURÃO, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2013). Para as ulvanas, já foi demonstrado que a sulfatação química aumenta a atividade anticoagulante destes polímeros (WANG *et al.*, 2013).

A presença de grupos carboxila livre também é importante para esta atividade, conforme já observado para a heparina, quitina e carragenanas (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986; NISHIMURA *et al.*, 1986; SANTOS, 2015). Sendo assim, os grupos carboxila presentes nas ulvanas também podem influenciar na atividade anticoagulante deste polímero.

Com a finalidade de observar o efeito do aumento do teor de grupos carboxila na atividade anticoagulante de ulvanas, no presente trabalho, ulvanas de *Ulva fasciata* foram submetidas ao processo oxidativo sequencial via periodato-clorito. Para este fim, o íon periodato oxida hidroxilas vicinais e leva à ruptura da ligação carbono-carbono, formando dois grupos aldeído em cada uma das unidades oxidadas. Estes grupos são passíveis de oxidação até ácidos carboxílicos pela reação com o clorito de sódio (GOLDSTEIN *et al.*, 1965; DACANELE; MONTANARI, 1986).

De acordo com a literatura, a oxidação periodato-clorito para a celulose originou novos polímeros com potencial aplicação como nanofibras (KIM; KUGA, 2001). Ainda, mananas oxidadas via periodato-clorito e revestidas com nanopartículas de óxido de ferro apresentaram atividade imunomodulatória e menor citotoxicidade em relação à manana nativa revestida (VU-QUANG *et al.*, 2012).

Para as ulvanas, a oxidação via periodato-clorito pode originar um produto com alto caráter aniônico, devido ao aumento do teor de carboxilas e da presença de grupos sulfato. Diante disso, este trabalho tem como objetivo oxidar ulvanas via periodato-clorito e avaliar o efeito desta modificação na atividade anticoagulante e nas propriedades físico-químicas destes polímeros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE MACROALGAS MARINHAS

As macroalgas marinhas são organismos pluricelulares, eucariontes e fotossintetizadores pertencentes ao reino *plantae*. São isentos de flores, sementes e estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas, apresentando, portanto, uma estrutura menos complexa quando comparada com plantas superiores. São classificadas em três filos: *Phaeophyta*, *Rhodophyta* e *Chlorophyta*, os quais correspondem às algas pardas, vermelhas e verdes, respectivamente (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A parede celular destas algas é composta por um componente fibrilar rígido e um amorfo. Esta matriz amorfa pode corresponder a até 70% do peso seco da alga e é formada por uma gama estrutural diversificada de polissacarídeos bioativos e de interesse industrial. De uma maneira geral, as algas vermelhas biossintetizam galactanas sulfatadas; as algas pardas alginatos e fucanas sulfatadas e as algas verdes ulvanas e ramnanas sulfatadas. (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; MAEDA *et al.* 1991).

As galactanas sulfatadas do tipo carragenana são formadas por díades repetitivas de β -D-galactopiranosose ligadas ao carbono 3 (C-3) e de α -D-galactopiranosose ligadas ao carbono 4 (C-4) (USOV, 1984). São utilizados principalmente na indústria alimentícia, sendo que em 2011, o valor comercializado destes polímeros foi estimado em 640 milhões de dólares (CARRAGEENAN, 2014).

O alginato é um polissacarídeo formado por unidades de ácido β -D-manurônico e α -L-gulurônico 4-ligados (DUARTE; GORIN; DUARTE, 1991). Este polímero é usado em implantes dentários, curativo para feridas e como suporte para imobilização de enzimas. De acordo com a FAO's (Food and Aquaculture Organization of United Nations, 2001), são produzidas mundialmente em torno de 30.000 toneladas de alginato, representando um mercado no valor estimado de 195 milhões de dólares.

Em relação às algas verdes, estudos têm demonstrado que as ulvanas também apresentam atividades biológicas, como por exemplo, anticoagulante, antitumoral e antihiperlipidêmica, além de propriedades físico-químicas de interesse biotecnológico, como por exemplo, a capacidade de formar gel e nanofibras. Portanto, estes polímeros possuem potencial para uso na área farmacêutica e biotecnológica (TOSKAS *et al.*, 2011; TOSKAS *et al.*, 2012; GADENNE *et al.*, 2013; MORELLI *et al.*, 2015; ALIPOUR *et al.*, 2018). No entanto, estes polímeros ainda não são explorados industrialmente.

Considerando que as ulvanas obtidas de algas verdes são o objeto de estudo do presente trabalho, a sua estrutura química e as suas propriedades biológicas e físico-químicas serão discutidas com mais detalhes adiante.

2.2 POLISSACARÍDEOS BIOSINTETIZADOS POR MACROALGAS VERDES DA ORDEM ULVALES

2.2.1 Estrutura química de ulvanas

O estudo inicial dos polissacarídeos biossintetizados pela alga verde *Ulva lactuca* mostrou que estes polímeros são formados por unidades de ramnose, ácidos urônicos e xilose (BRADING; GEORGE-PLANT; HARDY, 1954). Anos mais tarde, foi identificado como principal constituinte destes polímeros o dissacarídeo denominado ácido aldobiurônico, o qual é formado por unidades de β -D-ácido glucurônico ligado ao C-4 de unidades de α -L-ramnose ($[\beta$ -D-ácido glucurônico-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnose]) (PERCIVAL; WOLD, 1963).

Análises de metilação conduzidas com a ulvana de *U. lactuca* em sua forma nativa, carboxi-reduzida e dessulfatada indicaram a presença de unidades repetitivas com sulfatação no C-3 da ramnose (LAHAYE; RAY, 1996).

Posteriormente, Quemener, Lahaye e Bobin-Dubigeon (1997) propuseram uma nova metodologia de hidrólise para as ulvanas obtidas de *U. rígida* e *U. lactuca*. Sabe-se que a ligação glicosídica entre os ácidos urônicos e os monossacarídeos neutros é mais estável que as demais, pois a carboxila exerce um efeito indutivo o

qual dificulta a protonação da ligação glicosídica, originando dissacarídeos (BeMILLER, 1967). Logo, apenas a hidrólise ácida não é suficiente para a detecção dos monossacarídeos presentes em ulvanas.

A metodologia proposta por Quemener, Lahaye e Bobin-Dubigeon (1997) consiste na combinação de métodos de hidrólise ácida parcial e hidrólise enzimática (enzima β -D-glucuronidase). Esta combinação permitiu quantificar simultaneamente os monossacarídeos neutros e ácidos presentes em ulvanas, utilizando como ferramenta para detecção e quantificação dos monossacarídeos formados, cromatografia de troca aniônica de alta eficiência e detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Ainda, permitiu identificar pela primeira vez a presença do ácido idurônico como constituinte de ulvanas. Este monossacarídeo raro também está presente em glicosaminoglicanos, como por exemplo, a heparina e o dermatan sulfato (LINDAHL; AXELSSON, 1971).

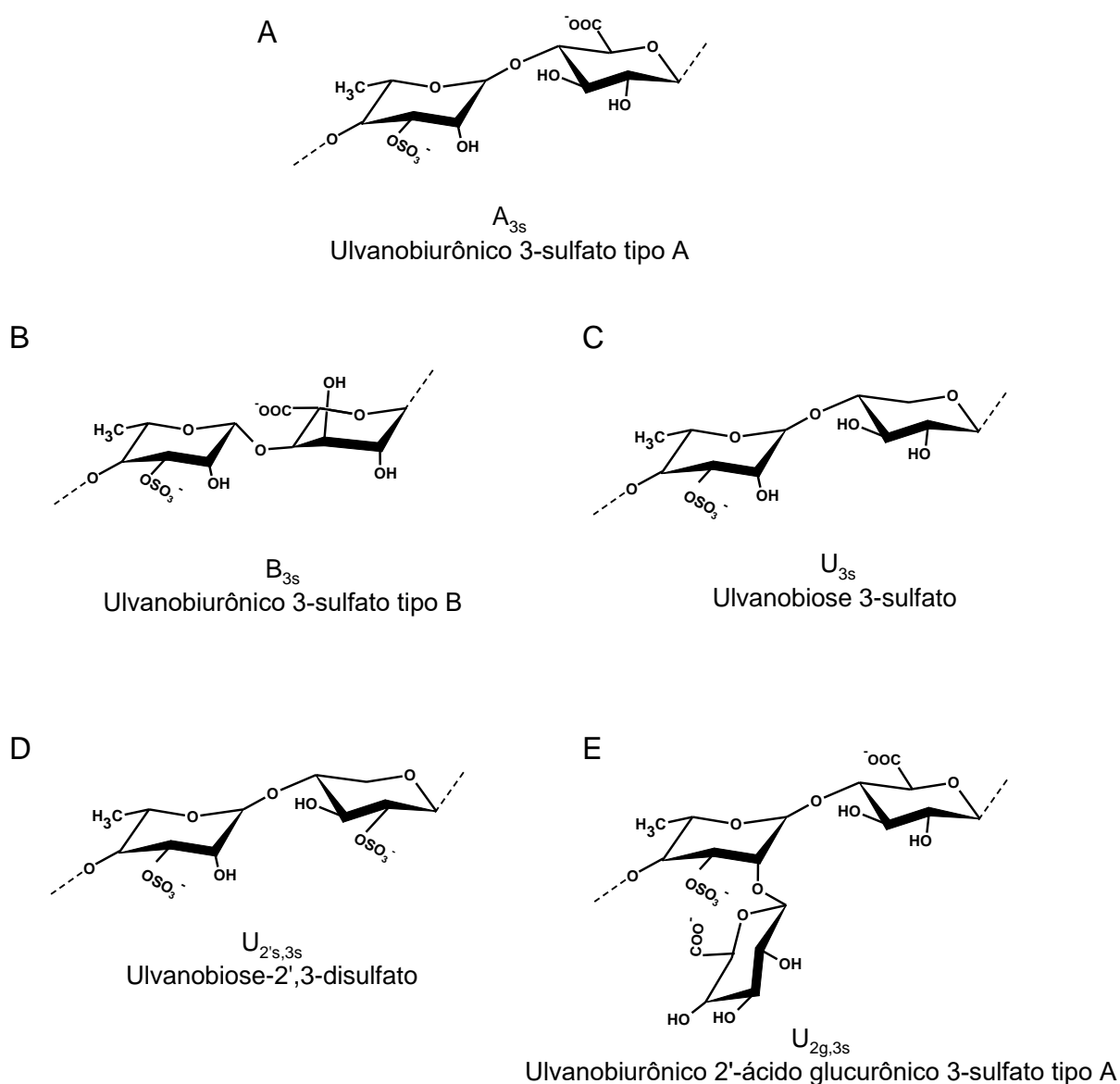
Desta maneira, a díade contendo β -D-ácido glucurônico foi denominada de ácido ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A (A_{3s}), enquanto que a díade contendo o ácido idurônico foi denominada de ácido ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B (B_{3s}). As díades de ácido ulvanobiurônico presentes nas ulvanas estão representadas nas figuras 1A e 1B.

A análise dos oligossacarídeos produzidos após o tratamento enzimático de ulvanas (*Ulva sp.*) com β -D-glucuronidase permitiu identificar, além das díades A_{3s} e B_{3s} , a díade formada por β -D-xilose ligada ao C-4 de unidades de α -L-ramnose 3-sulfato. Esta díade foi denominada ulvanobiose 3-sulfato (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997) (Figura 1C). Neste mesmo trabalho foram identificados pontos contendo unidades de β -D-ácido glucurônico entre duas díades A_{3s} . Estes pontos quebram a regularidade da sequencia dissacarídica e fornecem um ponto de clivagem para a enzima. Posteriormente, foi identificado o C-2 das unidades de β -D-xilose como outro possível sítio de sulfatação, formando a díade ulvanobiose 2',3-disulfato (LAHAYE, 1998) (Figura 1D).

A distribuição das díades ao longo da cadeia polissacarídica pode variar dentro de uma mesma espécie. Lahaye (1998) estudou os produtos obtidos após a degradação enzimática de ulvanas de *U. rigida* da região das ilhas Canárias (Espanha) e da Bretanha (França) e obteve oligossacarídeos com diferentes

padrões de distribuição das díades. Ambos apresentavam a sequência A_{3s} - A_{3s} -, $-A_{3s}$ - U_{3s} -, $-A_{3s}$ - $U_{2's,3s}$. No entanto, os exemplares das Ilhas Canárias apresentavam adicionalmente a sequência A_{3s} - U_{3s} - U_{3s} -, A_{3s} - $U_{2's,3s}$ - U_{3s} -, A_{3s} - $U_{2's,3s}$ - U_{3s} - U_{3s} . Já para os exemplares coletados na Bretanha foi demonstrado que a ramnose da díade A_{3s} pode estar ramificada em C-2 por unidades de β -D-ácido glucurônico dando origem a díade ácido ulvanobiurônico 2' ácido glucurônico, 3-sulfato tipo A ($A_{2g,3s}$), representada na figura 1E (LAHAYE, 1998).

FIGURA 1 - DÍADES REPETITIVAS PRESENTES EM ULVANAS



Para os polissacarídeos da espécie *Ulva fasciata*, foi descrita a presença das díades A_{3S}, B_{3S}, U_{3S} e U_{2'S,3S} (FREITAS *et al.* 2015; COLODI, 2017).

Além de xilose e ramnose, a presença de outros monossacarídeos neutros tais quais, glucose, metil-O-galactose e galactose também são reportadas para as ulvanas. Estes monossacarídeos foram atribuídos a outros polissacarídeos, os quais podem ser extraídos em conjunto com as ulvanas, como por exemplo, amido, celulose e hemiceluloses (QUEMENER; LAHAYE; BOBIN-DUBIGEON, 1997; LAHAYE *et al.*, 1999; ROBIC *et al.*, 2009).

Recentemente, Adrien e colaboradores (2017) submeteram ulvanas de *Ulva sp.* ao processo de auto-hidrólise (resina AMBERLITE, 24 horas, 80 °C) e obtiveram oligossacarídeos com grau de polimerização de aproximadamente 12. A análise por cromatografia líquida de desempenho ultraelevado acoplada a espectrometria de massas mostrou que estes compostos são formados por sequências dissacarídicas repetitivas de ramnose ligada a ácido urônico, conforme já descrito para as ulvanas. Adicionalmente, este trabalho mostrou que estas sequências podem ser interrompidas por uma hexose a cada dez unidades monossacarídicas. Sendo assim, as unidades de glucose e galactose também fariam parte da estrutura química das ulvanas.

2.2.2 Conformação de ulvanas e interação com íons

Ulvanas de diferentes espécies apresentam uma conformação desordenada, devido à distribuição irregular das unidades dissacarídicas ao longo de sua cadeia, conforme demonstrado através de estudos utilizando as técnicas de dicroísmo circular e titulação calorimétrica isotérmica. No entanto, a distribuição regular destas unidades em um ponto específico poderia levar a uma conformação ordenada. Nas regiões que apresentam distribuição regular das unidades dissacarídicas, a conformação pode assumir a forma de hélice através da interação do grupo sulfato com a hidroxila em C-2 do ácido idurônico. Ainda, para as unidades B_{3S}, a ordenação da conformação depende do equilíbrio das formas cadeira e barco das unidades de

ácido idurônico (PARADOSSI *et al.*, 1999; PARADOSSI; CAVALIERI; CHIESSI, 2002; LAHAYE; ROBIC, 2007).

Análises realizadas por cromatografia de exclusão por tamanho acoplada com viscosímetro demonstraram que estes polímeros, quando em solução, apresentam uma conformação esférica e formam agregados na presença de íons cobre e boro (ROBIC *et al.*, 2009).

2.2.3 Atividades biológicas de ulvanas

As diferentes atividades biológicas desempenhadas por polissacarídeos sulfatados dependem da interação destes polímeros com proteínas. Esta interação tem sido correlacionada com fatores estruturais, como por exemplo, caráter iônico devido a presença de grupos sulfato e a regioseletividade destes grupos na cadeia polissacarídica. Adicionalmente, a presença de regiões hidrofóbicas também pode estar relacionada com as atividades biológicas apresentadas pelos polímeros (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010; DAMONTE; MATULEWICZ; CEREZO, 2004).

As ulvanas apresentam grupos sulfato e carboxila, os quais conferem caráter iônico a estes polímeros. Ainda, a presença do desoxiaçúcar ramnose pode conferir certo caráter hidrofóbico em domínios específicos da cadeia polissacarídica. Portanto, as ulvanas representam uma matéria-prima com potencial para a produção de compostos bioativos.

Dentre os fatores estruturais apresentados pelas ulvanas, diferentes grupos de pesquisa têm correlacionado a presença e o teor de grupos sulfato com as atividades biológicas apresentadas por estes polímeros (CASTRO *et al.*, 2006; QI *et al.*, 2012; MAO *et al.*, 2006).

Ulvanas de *U. rigida* apresentaram atividade imunoestimulante através de testes *in vitro* utilizando leucócitos de fígado de peixe (*Psetta maxima* L.) e linhagem de macrófagos de murino Raw 264.7 (CASTRO *et al.*, 2006, LEIRO *et al.*, 2007). Estes polímeros aumentaram a capacidade respiratória dos leucócitos do fígado de

peixe a partir da concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após a dessulfatação química as ulvanas não apresentaram capacidade de aumentar a taxa respiratória dos leucócitos. Essa atividade foi recuperada após a sulfatação química, indicando que grupos sulfato são essenciais para a atividade imunoestimulante destes polímeros (CASTRO *et al.*, 2006).

Ulvanas de *U. rigida* e *U. pertusa*, quando introduzidas na dieta de hamster sírio Golden e de camundongos Wistar machos diminuíram os níveis de colesterol total e LDL (*low-density lipoprotein*) (PENGZHAN *et al.*, 2003; GORAD *et al.*, 2009).

As ulvanas possuem potencial aplicação na terapia anticoagulante. Ulvanas de *U. conglobata* foram fracionadas por cromatografia de troca aniônica, tendo sido obtido ulvanas com diferentes graus de sulfatação (23,04 a 35,2 %). Estas ulvanas apresentaram atividade anticoagulante pelo teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). A fração com maior percentagem de grupos sulfato (35,2 %) teve maior atividade anticoagulante, apresentando um tempo de APTT de 250 segundos na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (tempo normal da coagulação sanguínea de 40,2 s). Para a fração com menor teor de sulfato (23,04 %), o tempo de APTT de 250 s foi alcançado na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (MAO *et al.*, 2006). Portanto, o aumento no teor dos grupos sulfato está relacionado com a atividade anticoagulante de ulvanas de *U. conglobata*. A atividade anticoagulante destas ulvanas foi menor quando comparada com a heparina, o fármaco de escolha na clínica médica para distúrbios da hemostasia (MAO *et al.*, 2006).

Estes polissacarídeos sulfatados também apresentam potencial uso na terapia antitumoral. Ulvanas de *U. fasciata* diminuíram a viabilidade celular da linhagem DLD de células tumorais de intestino pelo teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) nas concentrações polissacarídicas de 250 a $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 48 horas. (SHAO *et al.*, 2014). Já ulvanas de *U. lactuca* foram citotóxicas contra linhagens tumorais de HepG2 (câncer de fígado), MCF7 (câncer de mama) e Hella (câncer cervical) apresentando no tempo de tratamento de 48 h, IC_{50} de 29,7, 25,1 e $36,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente (THANH *et al.*, 2016).

Embora as ulvanas apresentem citotoxicidade contra células tumorais, o tratamento de linhagens de fibroblasto L-929 com ulvanas não provocou diminuição na viabilidade celular quando avaliado pelo teste do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-

(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio) na concentração de 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, este resultado sugere que ulvanas não apresentam citotoxicidade contra linhagens celulares não tumorais em baixas concentrações (ALVES; SOUSA; REIS, 2013).

Visando investigar se estes polímeros podem apresentar toxicidade *in vivo*, Qi *et al.* (2013) administrou ulvanas de *U. pertusa* via oral em ratos Wistar machos e fêmeas nas doses de 600, 1200 e 3000 mg.kg^{-1} durante 6 meses. O trabalho demonstrou que em ratos machos houve aumento no tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e tempo de protrombina (PT) a partir da dose 1200 mg.kg^{-1} , indicando portanto, que a ulvana pode provocar distúrbios na coagulação. Já para ratos fêmeas, foi observado indício de dano hepático a partir da dose de 3000 mg.kg^{-1} . Dessa maneira, apesar dos resultados sugerirem que a administração de ulvanas em baixas concentrações é segura, a administração de doses extremamente elevadas pode causar efeitos adversos.

2.2.4 Propriedades físico-químicas das ulvanas

Além das propriedades biológicas de interesse na área biomédica, ulvanas de diferentes espécies são capazes de formar gel e nanofibras, características de interesse em áreas como engenharia de tecidos e em sistemas de liberação controlada de fármacos (TOSKAS *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2012; TOSKAS *et al.*, 2012; GADENNE *et al.*, 2013; MORELLI *et al.*, 2015; ALIPOUR *et al.*, 2018; SHAO *et al.*, 2017).

Ulvanas de *Ulva lactuca* formam gel em concentrações acima de 1g% p/v, em pH 7,5-8,0 e na presença de íons boro e cálcio, sendo que a presença de ambos os íons é requerida para a geleificação (HAUG, 1976; LAHAYE; AXELOS, 1993). Os fatores que são deletérios para a formação de gel por ulvanas são: pH maior que 8,0, alta concentração de íons e tampões TRIS e fosfato (LAHAYE; AXELOS, 1993).

Devido a estas propriedades físico-químicas, aplicações biotecnológicas nas áreas de engenharia de tecido e de liberação controlada de fármacos têm sido investigadas para ulvanas.

Membranas formadas por ulvanas (*Ulva sp.*) e éter diglicidil 1,4-butanodiol (BDDE) na proporção de 1:5 molar mostraram-se promissoras para sistemas de liberação controlada de dexametasona, um anti-inflamatório da classe dos corticosteroides. O BDDE é um epóxido citocompatível utilizado para realizar reações de *cross-linking* com polissacarídeos e a sua presença em membranas aumenta a resistência mecânica destes sistemas. As membranas de ulvana e BDDE contendo dexametasona foram proposta por Alves *et al.* (2012) como potenciais materiais para curativo de feridas.

Gadenne *et al.* (2013) analisaram as propriedades antibacterianas do titânio, quando ligado covalentemente ao grupo carboxila dos ácidos urônicos das ulvanas de *U. rotundata* e *U. compressa*. Ensaio de adesão bacteriana demonstraram que este sistema é capaz de inibir a adesão de bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*.

Ulvanas de *U. rigida* formaram nanofibras na presença de álcool polivinílico e de quitosanas (β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-glucosamina e β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-D-glucose). O complexo polieletrólito formado por ulvana e quitosana serviu como substrato para cultivo de osteoblastos, apresentando, portanto, potencial aplicação na área de engenharia de tecido (TOSKAS *et al.*, 2011; TOSKAS *et al.*, 2012).

Morelli e colaboradores (2015) funcionalizaram as hidroxilas secundárias das ulvanas com acrilato e então inseriram o grupo termossensível poli-isoacrilamida. Após esta modificação, as ulvanas foram capazes de formar hidrogéis termossensíveis cuja transição sol-gel ocorreu em 30-31°C. Portanto, as ulvanas representam uma matéria-prima para a produção de hidrogéis, os quais podem ter aplicação em diferentes áreas biotecnológicas.

Ulvanas também apresentam potencial aplicação na indústria alimentícia, devido a sua capacidade de formar emulsões e de estabilizá-las (ALIPOUR *et al.*, 2018; SHAO *et al.*, 2017).

Ulvanas de *U. intestinalis* aumentaram a capacidade emulsificante de pastas de surumi, um alimento a base de peixes e frutos do mar amplamente utilizado na culinária japonesa (ALIPOUR *et al.*, 2018). Para as ulvanas de *U. fasciata* foi demonstrado a ação emulsificante em preparações óleo/água contendo limoneno na

presença de cálcio ($0,01$ a $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$). O limoneno é biossintetizado por frutas cítricas como o limão e é usado na indústria alimentícia como aromatizante (SHAO *et al.*, 2017).

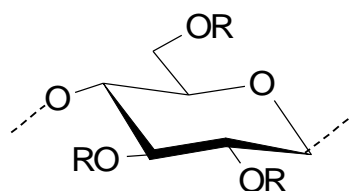
2.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS

Cadeias polissacarídicas apresentam grupos funcionais tais quais hidroxilas primárias, secundárias e grupos carboxila, os quais podem ser funcionalizados originando novas biomoléculas com propriedades diferenciadas em relação ao polímero original (JOST *et al.* 1974; LAVAZZA *et al.*, 2011; REDOUAN *et al.*, 2011; QI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013; NASATO *et al.*, 2015).

Diferentes modificações químicas já são utilizadas com sucesso para a celulose, polissacarídeo obtido de plantas e bactérias formado por unidades de β -D-glucose 4-ligadas (Figura 2). A partir da celulose são obtidos a metilcelulose e a carboximetilcelulose, as quais são utilizadas na indústria alimentícia como agente emulsificante e em formulações cosméticas e farmacêuticas (NASATO *et al.*, 2015).

Dentre os polissacarídeos comerciais obtidos de macroalgas marinhas, a agarose é utilizada para a obtenção de derivados aminados, os quais apresentam potencial aplicação como suporte para imobilização de enzimas (JOST *et al.*, 1974). Desta maneira, modificações químicas em polissacarídeos podem ampliar suas possíveis aplicações industriais.

FIGURA 2 - UNIDADE REPETITIVA DA CELULOSE E DE SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS



Onde R = H (celulose), ou CH₃ (metilcelulose) ou CH₂CO₂H (carboximetilcelulose)

Fonte: O autor (2017)

Várias estratégias são aplicadas para a modificação química de polissacarídeos por meio de reações químicas há muito tempo utilizadas na síntese de carboidratos. Em geral, os grandes desafios são a promoção de modificações de forma regioseletiva e a caracterização estrutural do produto formado.

Dentre as estratégias adotadas para a modificação química de polissacarídeos, a sulfatação de polissacarídeos é um dos procedimentos mais utilizados. A modificação de hidroxilas primárias e secundárias origina um polímero com cargas negativas e o polieletrólito obtido pode apresentar potencial aplicação como análogo da heparina (PETIT *et al.*, 2004; PAPY-GARCIA *et al.*, 2005). A sulfatação química também pode promover um aumento da atividade antitumoral de polissacarídeos (CHO *et al.*, 2011).

Para as ulvanas, a sulfatação química duplicou a atividade anticoagulante e aumentou em 40% a atividade anti-hiperlipidêmica, quando comparado com as ulvanas nativas (QI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013).

Outra modificação química que tem sido estudada por diferentes grupos de pesquisa é a oxidação de polissacarídeos (LAVAZZA *et al.*, 2011; REDOUAN *et al.*, 2011; SANTOS, 2015).

Os efeitos do aumento do teor de grupos carboxila em polímeros têm sido estudados para polissacarídeos obtidos de plantas e bactérias através da oxidação seletiva do álcool primário em C-6, mediada pelo TEMPO (radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) (LAVAZZA *et al.*, 2011; REDOUAN *et al.*, 2011; BENHAMOU *et al.*, 2013). Esta oxidação pode originar mudanças quanto às propriedades biológicas ou reológicas de polissacarídeos, como observado para gelanas e galactomananas (LAVAZZA *et al.*, 2011; REDOUAN *et al.*, 2011).

A gelana é um polissacarídeo produzido pela bactéria não patogênica *Sphingomonas elodea* ATCC 3146 e é formado pela unidade tetrassacarídica [$\rightarrow,3$]- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow) (MAZEN; MILAS; RINAUDO, 1999). A oxidação deste polissacarídeo origina polissacarídeos tipo-ulvana (*ulvan-like*) e ocasiona um aumento na atividade antioxidante para os radicais superóxido e hidroxil de aproximadamente nove vezes (REDOUAN *et al.*, 2011).

Para a galactomanana, a oxidação com TEMPO provocou alterações no perfil reológico, ocasionando mudança no comportamento das soluções deste polissacarídeo de viscosa para gel elástico (LAVAZZA *et al.*, 2011).

Destaca-se ainda que a presença de grupos carboxila em uma molécula pode estar relacionada com sua atividade anticoagulante, como já observado para a heparina e para as carragenanas (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986; SANTOS, 2015).

Agarwal e Danishefsky (1986) converteram o grupo carboxila dos ácidos urônicos da heparina em grupos metil éster e observaram perda da atividade anticoagulante após esta modificação. Este resultado indica que a presença de grupos carboxila livre é essencial para a atividade anticoagulante da heparina.

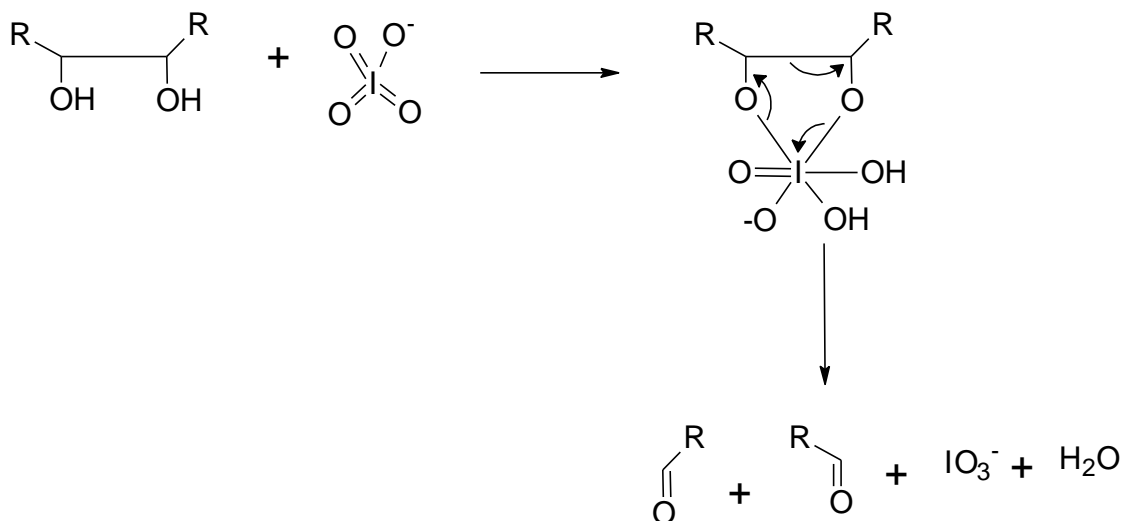
Carragenanas oxidadas obtidas após a reação com o reagente TEMPO apresentaram maior atividade anticoagulante em relação ao polímero nativo (SANTOS, 2015). Deste modo, o aumento do teor de grupos carboxila em polissacarídeos através de modificações químicas pode produzir um efeito positivo na atividade anticoagulante destes polímeros.

2.4 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS VIA OXIDAÇÃO COM PERIODATO E CLORITO DE SÓDIO

2.4.1 Oxidação de polissacarídeos com periodato

Na reação de oxidação de polissacarídeos com periodato, este íon promove uma clivagem oxidativa de hidroxilas vicinais, acarretando na ruptura da ligação carbono-carbono e na formação de dois grupos aldeídos em cada uma das unidades oxidadas (GOLDSTEIN *et al.*, 1965; PERLIN, 2006). O íon periodato forma como intermediário um éster de periodato cíclico planar (Figura 3)

FIGURA 3 - MECANISMO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM PERIODATO



Fonte: O autor (2017)

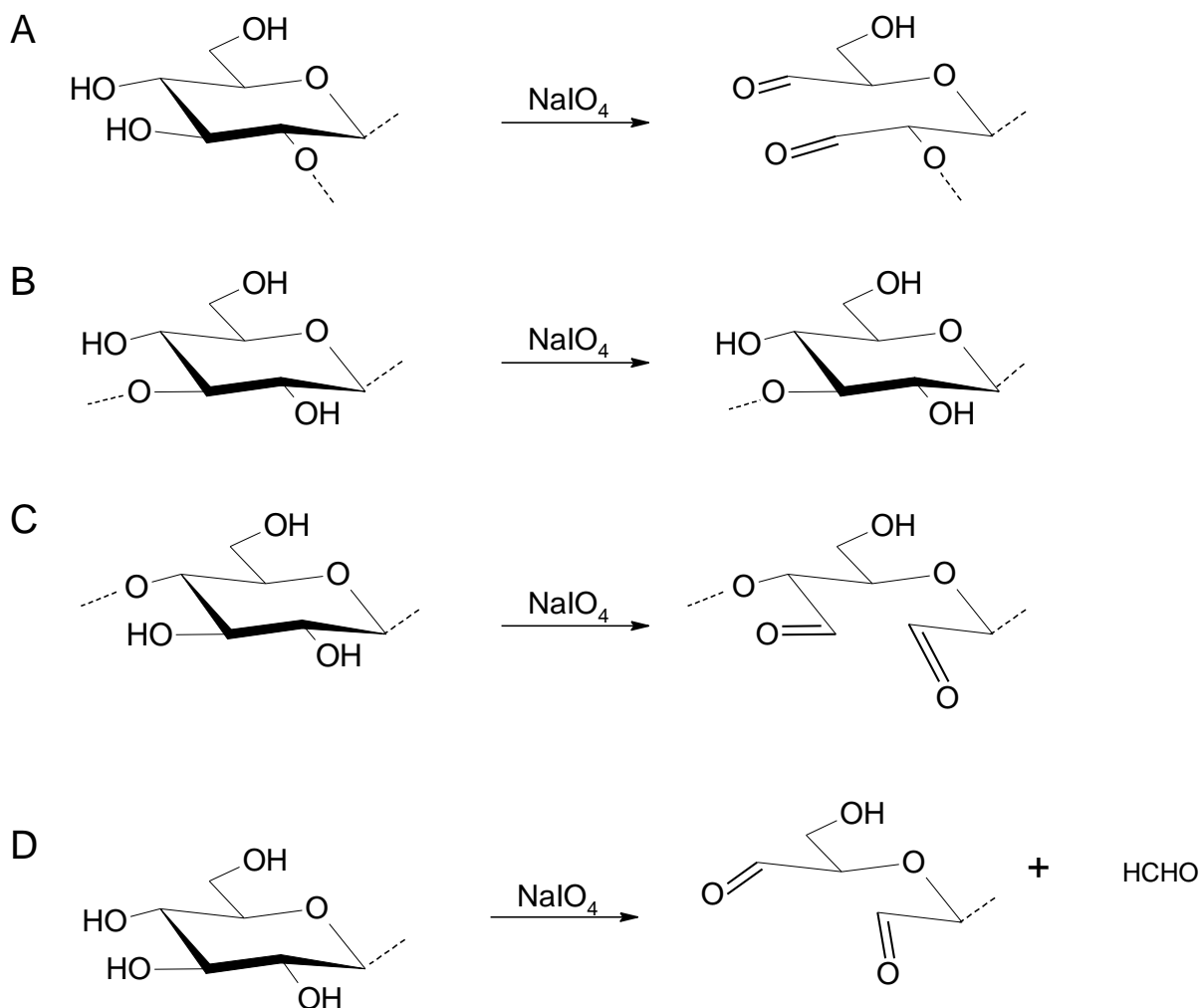
Considerando que a oxidação com periodato depende da presença de hidroxilas vicinais, esta reação ocasiona a oxidação de unidades monossacarídicas 1→2, 1→4, e 1→6 ligadas. As unidades 1→3 ligadas são resistentes a esta oxidação. Na figura 4 estão representados como exemplo os produtos obtidos a partir da oxidação com periodato da glucose em diferentes tipos de ligações glicosídicas.

Quando em solução, o grupo aldeído em solução pode formar outras estruturas, como por exemplo, dióis e hemiacetais.

Aldeídos reagem com água através de uma reação de adição nucleofílica a compostos carbonílicos, formando dióis. O mecanismo desta reação está representado na figura 5. A formação de diol pode ocorrer tanto em meio ácido quanto em meio básico. O meio ácido torna o carbono da carbonila mais eletrofílico, enquanto que o meio básico torna o oxigênio da água mais nucleofílico. (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

O grupo aldeído também pode reagir com o grupo hidroxila de uma unidade não oxidada através de um mecanismo de adição nucleofílica ao carbono da carbonila, formando hemiacetais. A taxa de formação de hemiacetais em meio neutro é baixa, mas ela pode aumentar quando em meio ácido ou básico. Uma representação geral do mecanismo de reação da formação de hemiacetais está ilustrada na figura 6 (LARSEN; PAINTER, 1969; PAINTER; LARSEN 1970).

FIGURA 4 - UNIDADES DE GLUCOSE OXIDADAS COM PERIODATO

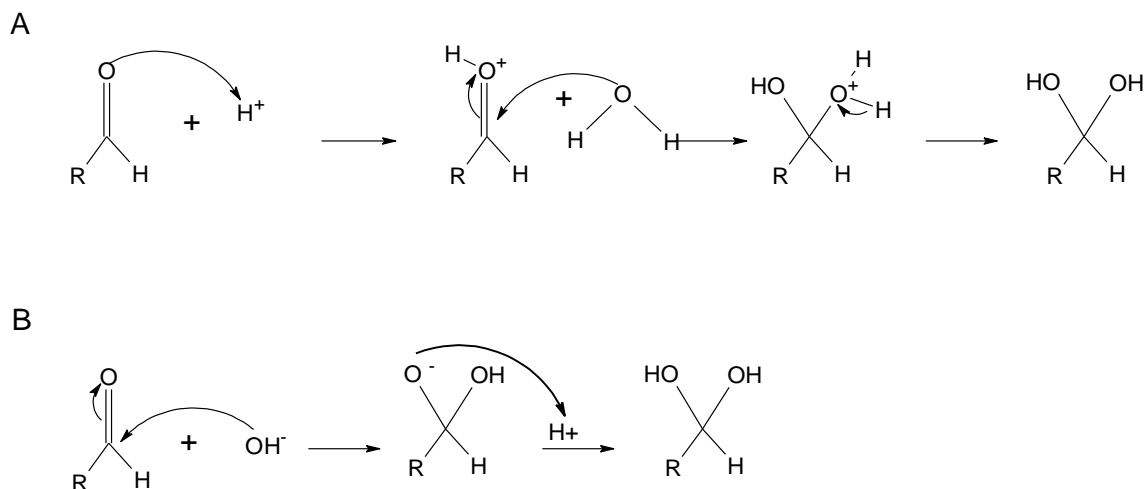


Na figura está representada a oxidação com periodato de unidades de glucose ligadas 1→2 (A), 1→3 (B), 1→4 (C) e terminal não redutor (D).

Fonte: O autor (2017).

O produto da reação de hemiacetais em carboidratos após oxidação com periodato é um hemiacetal cíclico de seis membros. O hemiacetal cíclico é mais estável em comparação com hemiacetais não cíclicos (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

FIGURA 5 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DE DIOL



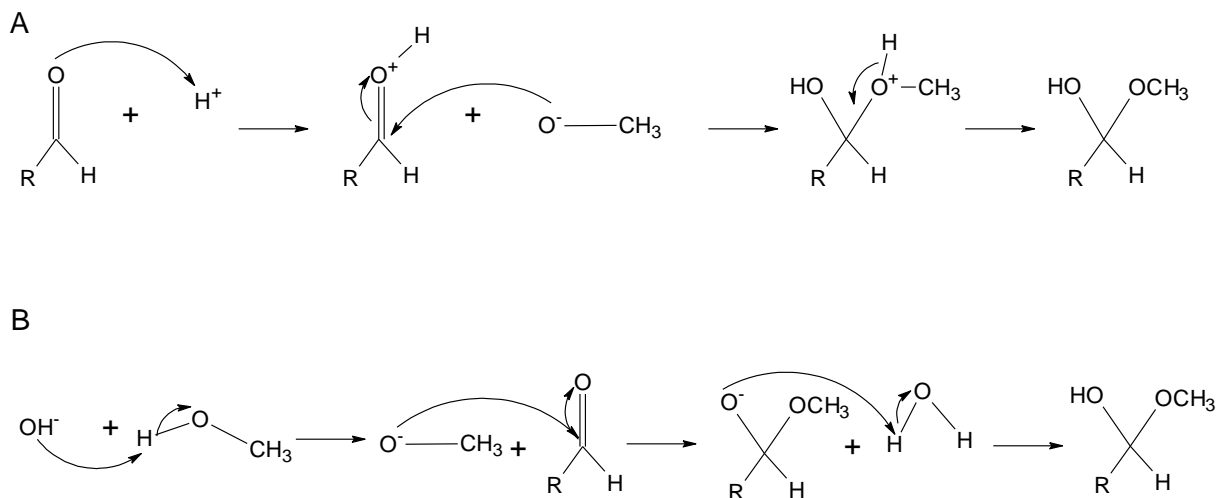
Mecanismo de formação de dióis em meio ácido (A) e em meio básico (B).

Fonte: O autor (2017)

Evidências da formação de hemiacetais após a oxidação com periodato surgiram após os estudos de Larsen e Painter (1969). Estes autores observaram que os alginatos, apesar de serem constituídos por unidades monossacarídicas 4-ligadas apresentam um limite de oxidação com periodato de apenas 44-55%. Quando este alginato é reduzido com NaBH_4 e re-oxidado com NaIO_4 , esta oxidação chega próximo a 100 %. Esta observação foi atribuída a formação de hemiacetais na primeira etapa de oxidação (LARSEN; PAINTER, 1969, PAINTER; LARSEN, 1970).

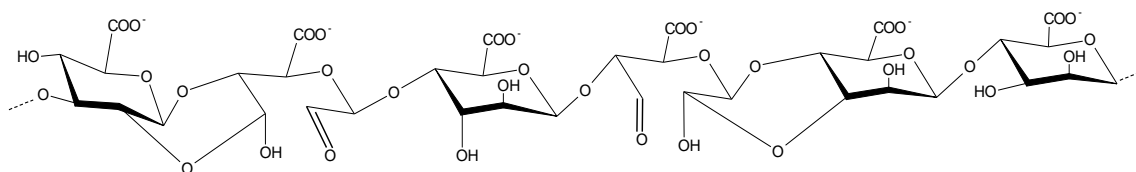
Ainda, Forseberg e Pazur (1979) analisaram os produtos de oxidação obtidos a partir de heteroglucanas. Devido ao grupo OH^- das unidades não oxidadas estar em ligação com o aldeído da unidade oxidada, foram identificados derivados mono e di-metilados. Através dos derivados obtidos, foi possível verificar que a formação de hemiacetais ocorre entre o aldeído de uma unidade oxidada com a hidroxila da unidade vizinha não oxidada (Figura 7). A formação de hemiacetais após a oxidação com periodato também ocorre com xilanas, amilose e dextranas (LARSEN; PAINTER, 1970b; LARSEN; PAINTER, 1970c; ISHAK; PAINTER, 1978).

FIGURA 6 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DE HEMIACETAL



Mecanismo de formação de hemiacetal em meio ácido (A) e em meio básico (B). Na figura está representada a reação entre um aldeído de fórmula $(\text{CHO})_n$ com a hidroxila do metanol.
 Fonte: O autor (2017).

FIGURA 7 - FORMAÇÃO DE HEMIACETAIS EM ALGINATO APÓS OXIDAÇÃO COM PERIODATO



Fonte: O autor (2017)

2.4.2 Características dos produtos obtidos após a oxidação de polissacarídeos com periodato

A oxidação de polissacarídeos com periodato produz derivados dialdeídicos com propriedades físico-químicas distintas em relação ao polímero original, conforme observado para alginatos (GOMEZ; RINAUDO; VILLAR, 2007), quitosanas (CHRISTENSEN; VOLD; VÅRUM, 2008) e dextranas (MAIA *et al.*, 2011).

A oxidação com periodato promove uma ruptura da ligação carbono-carbono, podendo, portanto, obter através desta reação um polímero de cadeia menos rígida

quando comparado com o polímero original. A diminuição da rigidez da cadeia após a oxidação com periodato foi observado para alginatos (VOLD; KRISTIANSEN; CHRISTENSEN, 2006) e quitosanas (CHRISTENSEN; VOLD; VARUM, 2008).

Outra característica desta reação é a indução de uma extensa despolimerização devido à formação de radicais livres, mesmo em baixas temperaturas, na ausência de luz e na presença de antioxidantes (VEELAERT *et al.*, 1997; GOMEZ; RINAUDO; VILLAR, 2006; CHRISTENSEN; VOLD; VARUM, 2008).

Devido a oxidação com periodato de polissacarídeos originar novos produtos com propriedades físico-químicas diferenciadas em relação ao polímero original, diferentes aplicações nas áreas biomédicas e biotecnológicas têm sido investigadas para estes derivados (KANG; SHIN; YANG, 2002; KONG; KAIGLER; MOONEY, 2004; KRISTIANSEN; POTTHAST; CHRISTENSEN, 2010; DALHEIM *et al.*, 2016; JING *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2018).

Hidrogéis formados por alginatos 2,3-dialdeído apresentaram maior taxa de degradação em relação aos hidrogéis de alginato não modificado, característica a qual tem sido descrita como favorável para aplicações na área de engenharia de tecido (KONG *et al.*, 2004; KRISTIANSEN; POTTHAST; CHRISTENSEN, 2010).

Ainda, os grupos aldeído formados após a oxidação com periodato representam sítios de introdução de novos grupos funcionais, podendo, portanto, ampliar as possíveis aplicações dos polissacarídeos em diferentes áreas da biotecnologia.

Estudos recentes demonstram a obtenção de nanopartículas de amido fluorescentes após a oxidação com periodato de sódio e funcionalização do grupo aldeído com polidopamina (SHI *et al.*, 2018).

Diferentes grupos de pesquisa têm estudado a funcionalização de alginatos com grupos amino através da reação de oxidação com periodato e aminação redutiva (KANG *et al.*, 2002; DALHEIM *et al.*, 2016; JING *et al.*, 2017). A partir do grupo amino destes produtos podem ser ligadas moléculas bioativas covalentemente.

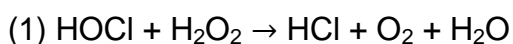
Dalheim e colaboradores (2016) ligaram covalentemente peptídeos ao grupo amino do alginato modificado via oxidação-aminação. Estes peptídeos podem promover interações celulares e estimular a diferenciação celular (DALHEIM *et al.*, 2016).

Recentemente, foi demonstrado por pesquisadores integrantes no grupo GLICAM-UFPR que as ulvanas de *U. fasciata* podem ser funcionalizadas com grupos amino via periodato-aminação redutiva (COLODI, 2017). Dando continuidade aos estudos de modificação química, o presente trabalho tem como objetivo modificar estas ulvanas via oxidação periodato-clorito, originando um produto com um maior teor de grupos carboxila.

2.4.3 Oxidação com clorito dos derivados dialdeídicos de polissacarídeos

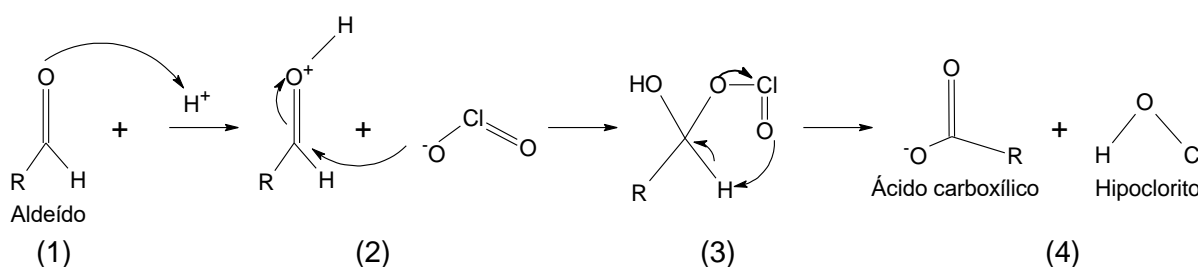
Grupos aldeído podem ser oxidados com clorito de sódio, originando grupos carboxila. O clorito de sódio é um reagente de baixo custo que oxida aldeídos em condições brandas (DALCANELE; MONTANARI, 1986). Esta reação ocorre por um mecanismo de oxidação, o qual está representado na figura 8. A reação se inicia com a protonação do oxigênio carbonílico do grupo aldeído (1) seguido do ataque dos elétrons da hidroxila do clorito ao carbono deste grupamento (2). Após a saída do cloro (3) então há a formação do ácido carboxílico (4) (LINDGREN; NILSSON, 1973).

Uma das reações secundárias da oxidação com clorito é a formação de hipoclorito, um forte agente oxidante. Para remover o excesso de hipoclorito, agentes antioxidantes são usados, sendo o mais comum o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual consome o excesso de HOCl para formar HCl e O_2 , conforme a reação 1 (DALCANELE; MONTANARI, 1986).



Em meio reacional ácido a velocidade da reação do hipoclorito com o H_2O_2 aumenta. A reação realizada em meio alcóolico resulta em maior rendimento quando realizada na presença de um álcool mais polar como solvente (DALCANELE; MONTANARI, 1986).

FIGURA 8 - MECANISMO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM CLORITO EM MEIO ÁCIDO



Fonte: O autor (2017)

2.4.4 Características e potenciais aplicações dos produtos obtidos após a oxidação com clorito de derivados dialdeídicos de polissacarídeos

A oxidação sequencial periodato-clorito tem sido investigada para a celulose, a partir da qual origina a 2,3-dicarboxil-celulose (DCC). Este produto apresentou uma menor cristalinidade em relação à celulose nativa. DCC's produzem fibras mais finas que aquelas produzidas pela celulose. A energia mecânica necessária para a desintegração destas fibras também é menor para os derivados dicarboxílicos quando comparado com o polissacarídeo nativo. Portanto, a oxidação periodato-clorito para a celulose origina produtos com potencial aplicação como nanofibras (VARMA; CHAVAN, 1995; LIIMATAINEN *et al.*, 2012).

As celulosas 2,3-dicarboxílicas também foram avaliadas quanto ao seu potencial uso como resina cromatográfica. A eluição de aminas usando gel de DCC como resina mostrou que a ordem de eluição é metilamina>dimetilamina>triethylamina em todos pH testados. Na resina de celulose comercial, essas aminas eluíram em um único tempo. Os diferentes tempos de eluição das aminas em gel de DCC podem ser explicados pelo impedimento estérico do grupo metil combinado à interação com os grupos dicarboxílicos (KIM; KUGA, 2001).

Outro tipo de polissacarídeo oxidado via periodato-clorito foram as mananas de *Saccharomyces cerevisiae*. As mananas dicarboxílicas foram revestidas com nanopartículas de óxido de ferro. Este produto foi capaz de se ligar com macrófagos *in vitro* e em *in vivo* (ratos ICR). A toxicidade das mananas dicarboxílicas revestidas foi menor quando comparada com a manana nativa revestida com a mesma nanopartícula (VU-QUANG *et al.*, 2012).

2.5 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS VIA OXIDAÇÃO COM PERIODATO E REDUÇÃO COM NaBH₄

A oxidação de polissacarídeos com periodato pode originar novos polímeros contendo grupos aldeído, os quais podem ser funcionalizados com diferentes grupos químicos como carboxila e amino. Estes grupos aldeído também podem ser reduzidos, originando um polímero com maior teor de hidroxilas primárias.

A oxidação com periodato seguida de redução com NaBH₄ para a heparina provoca a ruptura da ligação carbono-carbono das unidades de β-D-ácido glucurônico da sequência pentassacarídica de ligação à antitrombina. Estes produtos, denominados *glycol-split* heparinas (*gs-heparinas*) não apresentam atividade anticoagulante, uma vez que a sequência de ligação à antitrombina está alterada (CASU *et al.*, 2002; SCHLESINGER *et al.*, 2012; CASU; NAGGI; TORRI, 2015).

Dentre os efeitos biológicos apresentados pelas *gs-heparinas* está a interação com o fator de crescimento de fibroblasto, molécula envolvida no processo de angiogênese. As *gs-heparinas* também inibiram a atividade de proteínas de metástase (VLA-4) em linhagens celulares metastáticas de melanoma humano MV3. Portanto, estes polímeros apresentam potencial para aplicação em terapias antitumorais e antiangiogênicas (CASU *et al.*, 2002; SCHLESINGER *et al.*, 2012).

A interação das *gs-heparinas* com as proteínas citadas anteriormente é maior quando comparada com a heparina nativa. Esta característica tem sido atribuída à menor rigidez da cadeia polimérica, o que facilitaria a interação entre o polímero e as proteínas (CASU *et al.*, 2002; SCHLESINGER *et al.*, 2012).

Os efeitos biológicos provocados por derivados de mananas obtidos após oxidação-redução via periodato- NaBH_4 também têm sido investigados. As mananas oxidadas-reduzidas inibem os antígenos expressos por células tumorais MUC-1 (adenocarcinoma) e ovoalbumina (melanoma). Portanto, estes compostos são de interesse na busca de candidatos para a imunoterapia do câncer (TANG et al., 2008).

Dessa maneira, a redução dos grupos aldeído obtidos após a oxidação com periodato também representa uma estratégia de modificação química que pode originar polímeros inovadores e com potencial aplicação biomédica e biotecnológica.

2.6 HEMOSTASIA

A hemostasia é um mecanismo fisiológico presente em vertebrados cujo objetivo é a manutenção do equilíbrio de fatores vasculares e sanguíneos, permitindo assim, que o sangue seja transportado através de tubos fechados (veias e artérias) para os tecidos (VERRASTRO, 1999; COLMAN, 2006; CARLOS; FREITAS, 2007; FRANCO, 2001).

A lesão no vaso sanguíneo desencadeia dois processos complementares: a formação do coágulo e após a reparação da lesão, a dissolução deste coágulo. Ambos os processos ocorrem através de uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos cujo objetivo é controlar a perda de sangue e evitar a formação de trombos intravasculares (FRANCO, 2001; BOZINI; MOLINAS, 2004; COLMAN, 2006).

2.6.1 Coagulação

O modelo clássico do sistema de coagulação sanguínea proposto por Macfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964), também chamado de modelo em cascata, envolve duas vias: intrínseca (via do fator de contato) e extrínseca (via do fator tissular). Ambas consistem numa sequência de ativação proteolítica de

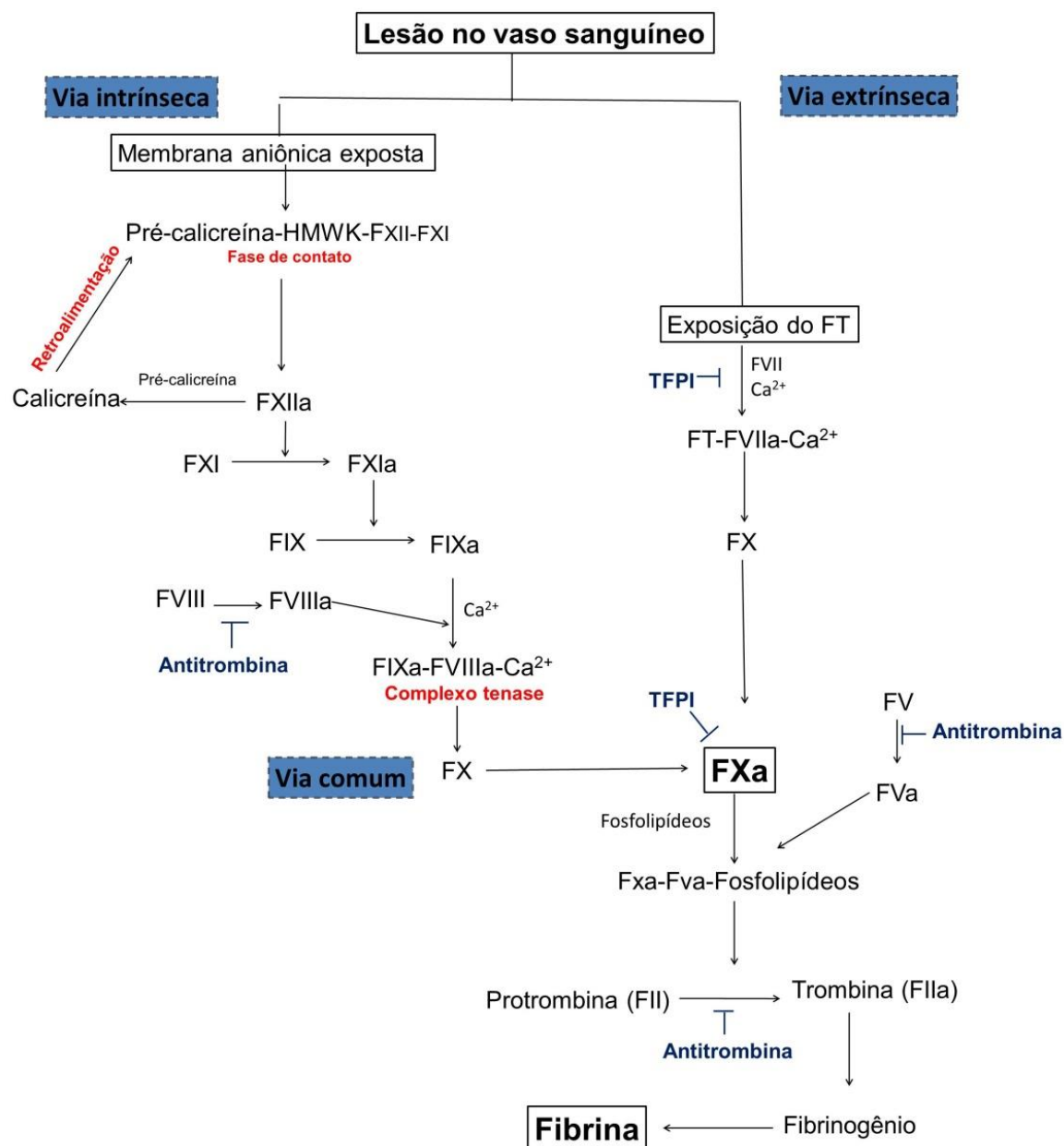
enzimas as quais levam à formação do fator Xa (fator X ativado), convergindo desta maneira, na via final comum, cujo objetivo é a conversão do fibrinogênio em fibrina (Figura 9).

A via intrínseca recebeu este nome após a observação que a coagulação sanguínea ocorre espontaneamente quando o sangue entra em contato com o colágeno ou com superfícies aniônicas. Nesta via, o fator desencadeante da coagulação está presente no meio intravascular. Este fator é uma tromboplastina tecidual denominada também de fator tissular (FT) expressa na camada endotelial dos vasos sanguíneos. Quando ocorre uma lesão no vaso, FT é exposto e liga-se ao fator FVII, o qual na presença de cálcio, é autocativado em FVIIa e forma o complexo FT-FVIIa- Ca^{2+} . Este complexo ativa o fator X, formando o fator Xa, o qual inicia a coagulação pela via final comum (DAVIE; RATNOFF, 1964; DRAKE; MORRISSEY; EDGINGTON, 1989; FRANCO, 2001; CARLOS; FREITAS, 2007; DEVLIN, 2007) (Figura 9).

Quando o vaso sofre uma injúria, sua membrana aniônica é exposta, desencadeando a ligação desta superfície com a pré-caliceína, um cininogênio de alta massa molar (*High molecular weight kininogen* – HMWK) e aos fatores XII e XI. Esta fase de adesão também é chamada de fase de contato, e tem como consequência a ativação do fator XII em XIIa. Por sua vez, o fator XIIa converte a pré-caliceína em caliceína, a qual por retroalimentação converte mais fator XII em XIIa. O fator XIIa converte o fator XI em XIa o qual, na presença de Ca^{2+} , ativa o fator IX. O IXa forma um complexo tenase juntamente com o fator VIIIa e o Ca^{2+} , desencadeando a ativação do fator X (Figura 9) (DAVIE; RATNOFF, 1964; FRANCO, 2001; CARLOS; FREITAS, 2007; DEVLIN, 2007).

Na via final comum da cascata de coagulação sanguínea, o fator Xa forma um complexo com o fator Va e com os fosfolípidos teciduais ou das plaquetas. A formação deste complexo desencadeia a conversão da protrombina (fator II) em trombina (fator IIa) (Figura 9) (FRANCO, 2001).

FIGURA 9 – VIA CLÁSSICA DA CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA



Fonte: O autor (2017)

Por sua vez, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina por proteólise, formando o coágulo. O coágulo é estabilizado pelo fator XIIIa, o qual é ativado pela trombina (FRANCO, 2001; CARLOS; FREITAS, 2007; DEVLIN, 2007).

A atividade das enzimas atuantes no processo de coagulação sanguínea é regulada por proteínas inibitórias, as quais impedem a produção excessiva de

fibrina. Dentre as numerosas proteínas inibitórias, as de maior importância fisiológica são: inibidor do fator tecidual (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*) e a antitrombina (AT) (FRANCO, 2001; PATEL; BERRY; CHAN, 2007). As atuações destes receptores na cascata de coagulação sanguínea estão representadas na figura 9.

TFPI é uma glicoproteína produzida pelas células endoteliais a qual apresenta três domínios (K-1, K-2 e K-3). O domínio K-1 inibe o complexo VIIa/FT, o K-2 inibe a atividade do fator Xa e o K-3 tem afinidade pela heparina e por outros glicosaminoglicanos (FRANCO, 2001).

A antitrombina é uma serpina inibidora de serino-protease produzida pelo fígado. É considerada a principal enzima inibitória da cascata de coagulação, atuando principalmente na inibição da atividade da trombina. Também inibe os fatores XIa, Xa e IXa da cascata de coagulação e acelera a dissociação do complexo FVIIa/TF (FRANCO, 2001; PATEL; BERRY; CHAN, 2007).

2.6.2 Heparina

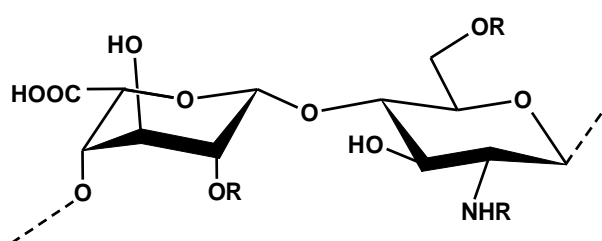
As heparinas são os agentes anticoagulantes e antitrombóticos comerciais adotados na clínica médica. Foi descoberta pela primeira vez em fígado de cães. No entanto, apesar do seu uso clínico como agente anticoagulante, o efeito fisiológico da heparina ainda é investigado (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Em relação à estrutura química, as heparinas são polissacarídeos sulfatados da classe dos glicosaminoglicanos, assim como o heparan e o dermatan sulfato. Sua massa molar varia entre 3000 e 30000 Da (PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003).

As heparinas são classificadas de acordo com a sua massa molar em heparina não fracionada (UFH) e heparina de baixa massa molar (LMWH). As UFH's são utilizadas no tratamento de trombose venosa profunda, síndromes coronarianas, coagulação intravascular disseminada, hemodiálise, cirurgia com circulação extracorpórea e em coleta de sangue. A via de administração é venosa ou subcutânea (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

A cadeia polissacarídica da UFH é constituída por unidades alternadas de ácido urônico e α -D-glucosamina unidos por ligações glicosídicas do tipo α ou β 1 \rightarrow 4, conforme representado na figura 10. O ácido urônico presente na heparina pode ser o ácido β -D-glucurônico ou α -L-idurônico. O ácido idurônico pode estar sulfatado em C-2. A maior parte das unidades de glucosamina é sulfatada nos grupos amino e hidroxil (N-SO_3 e 6-OSO_3). Ainda, algumas destas unidades podem estar sulfatadas em C-3 (CASU; NAGGI; TORRI, 2015).

FIGURA 10 - ESTRUTURA DISSACARÍDICA REPETITIVA DA HEPARINA



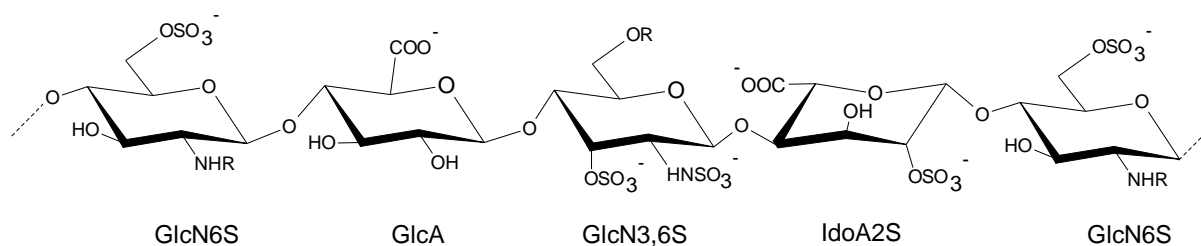
Nota: $\text{R} = \text{H}$ ou SO_3^- . Na figura está representado α -L-ácido idurônico, o qual pode ser substituído pelo β -D-ácido glucurônico.

Fonte: O autor (2017)

O mecanismo de ação da UFH é atribuído à ativação da antitrombina, ocasionando, portanto, a inibição da trombina. Esta atividade está atribuída à sequência pentassacarídica representada na figura 11, a qual é capaz de se ligar com a antitrombina. Ainda, em altas concentrações a UFH também pode provocar a inibição da trombina através da ativação do HCII (PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003).

Apesar de sua atividade anticoagulante o uso da heparina é limitado devido à heterogeneidade de sua estrutura química e aos efeitos adversos que este fármaco provoca, como, por exemplo, osteoporose, trombocitopenia e complicações hemorrágicas. Além disso, há o risco de contaminação por patógenos devido à sua origem de fonte animal (MENAJOVSKY, 2005; GREINACHER; WARKENTIN, 2006).

FIGURA 11 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA



Fonte: O autor (2017)

A heparina pode ser obtida da mucosa intestinal de suínos ou de pulmões de bovinos. No entanto, após os problemas enfrentados com a encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca), somente a heparina suína é comercializada nos Estados Unidos da América e na Europa (DE KORT; BUIJSMAN; VAN BOECKEL, 2005).

Com o objetivo de melhorar o perfil farmacocinético e farmacológico da heparina, foram desenvolvidas heparinas de menor massa molar (LMWH). As LMWH também possuem a sequência pentassacarídica para ligação à antitrombina. Porém, diferentemente das UFH, a ligação das heparinas de alta massa com a antitrombina induz a inibição principalmente do fator Xa. As LMWH's inibem a trombina em menor proporção quando comparado com as UFH's (COHEN, 2000; CAUGHEY, 2003).

As LMWH's apresentam melhor biodisponibilidade e maior tempo de meia vida quando comparado com as UFH's, diminuindo, portanto, o número de administrações diárias. Os efeitos adversos também são menores em relação à heparina não fracionada (CAUGHEY, 2003). Porém, estes polímeros ainda apresentam algumas limitações como à heterogeneidade estrutural e o risco de contaminação por patógenos de animais (CAUGHEY, 2003).

Devido a estes fatores, têm sido buscadas alternativas ao uso da heparina. Dentro deste contexto, diferentes tipos estruturais de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas apresentam atividade anticoagulante. Além disso, estes polímeros são obtidos a partir de fontes renováveis e passíveis de cultivo, tornando-os, portanto, promissores para uso na terapia de distúrbios da hemostasia (NISHINO

et al., 1991; NISHINO; TAKABE; NAGUMO, 1994; MOURÃO *et al.*, 1996 CARLUCCI *et al.*, 1997; CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2013). A atividade anticoagulante dos polissacarídeos de macroalgas marinhas será discutida adiante.

2.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE MACROALGAS

Diferentes tipos estruturais de polissacarídeos sulfatados biossintetizados por algas marinhas apresentam atividade anticoagulante. Esta atividade depende não somente da presença de grupos sulfato, mas também, do posicionamento específico destes grupos na molécula, conforme já observado para as carragenanas, polissacarídeos obtidos de macroalgas vermelhas (CARLUCCI *et al.*, 1997; CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2013).

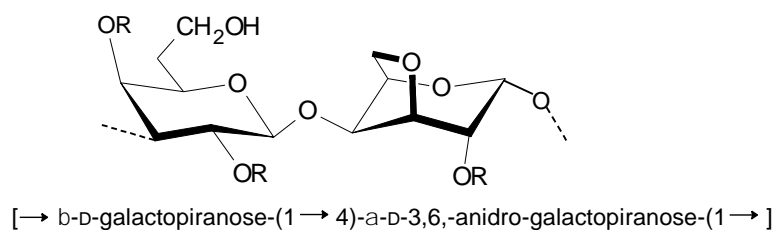
As carragenanas são polissacarídeos formados por unidades alternadas de β -D-galactopiranosose ligadas em C-3 (unidades A) e de α -D-3,6-anidro-galactopiranosose ou α -D- galactopiranosose ligadas em C-4 (unidades B), conforme representado na figura 12A (USOV, 1984). De acordo com o posicionamento do grupo sulfato na unidade A, as carragenanas são agrupadas em duas principais famílias: *kappa* (κ) e *lambda* (λ). κ e λ -carragenanas apresentam grupos sulfato na unidade B, conforme representado na figura 12B (USOV, 1984).

Carragenanas pertencentes à família λ apresentam maior atividade anticoagulante quando comparadas com as da família κ . Essa maior atividade anticoagulante é observada mesmo com teores similares de grupo sulfato (CARLUCCI *et al.*, 1997).

Para o desempenho da atividade anticoagulante, os polissacarídeos devem apresentar uma conformação aleatória quando em solução a qual deve ser capaz de mudar para uma conformação ordenada para a formação do complexo polissacarídeo/proteína da cascata de coagulação. Desta maneira, cadeias polissacarídicas cuja transição é lenta apresentam menor atividade anticoagulante quando comparado a cadeias que são capazes de adquirir a conformação ordenada mais facilmente (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010).

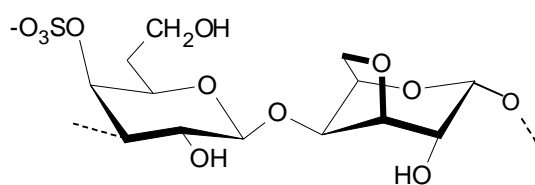
FIGURA 12 - SEQUÊNCIA DISSACARÍDICA REPETITIVA PRESENTE NAS CARRAGENANAS (A) E ESTRUTURA GERAL DAS CARRAGENANAS DA FAMÍLIA *KAPPA* E *LAMBDA* (B)

A

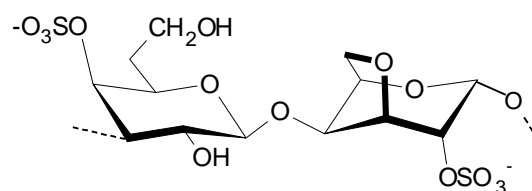


B

Família kappa

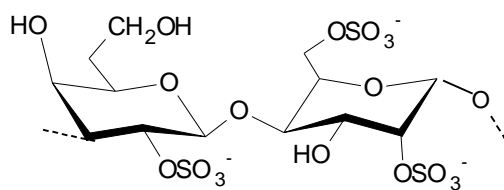


k-carragenana

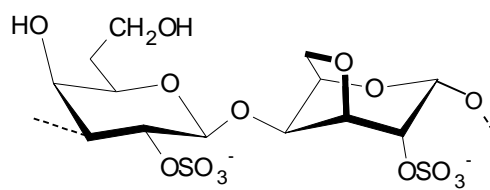


i-carragenana

Família lambda



l -carragenana



q-carragenana

Fonte: O autor (2017)

O posicionamento dos grupos sulfato nestes dois tipos de carragenanas faz com que estas estruturas apresentem diferentes conformações ordenadas. As λ -carragenanas apresentam uma conformação ordenada em fita, a qual é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o C-2 da unidade A com o C-3 da unidade B. Já as

κ -carragenanas apresentam-se como hélice (MORRIS *et al.*, 1978; CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

Além de influenciar a conformação ordenada destes polímeros, o posicionamento dos grupos sulfato influencia a capacidade destas estruturas adquirirem esta formação ordenada (CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

As carragenanas da família λ apresentam maior facilidade em adquirir uma conformação ordenada quando comparada com a κ -carragenana. Essa maior facilidade em adquirir a conformação ordenada pode ser um dos fatores que expliquem a maior atividade anticoagulante das λ -carragenanas em relação às κ -carragenanas (MORRIS *et al.*, 1978; CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

Dentro da família λ , as λ -carragenanas também apresentam maior atividade anticoagulante quando comparadas com as θ -carragenanas. Esta observação pode ser consequência da maior dificuldade apresentada pelas θ -carragenanas em adquirir uma conformação ordenada, visto que com ciclização da unidade B não é mais possível formar ligações de hidrogênio entre o sulfato em C-2 da unidade A com o hidroxil em C-3 da unidade B (CARLUCCI *et al.*, 1997).

Estudos de sulfatação química seletiva de carragenanas produziram díades as quais não são encontradas na natureza, permitindo correlacionar o posicionamento dos grupos sulfato com a atividade anticoagulante de carragenanas. κ -carragenanas apresentam um tempo de APTT de 52,6 s (tempo de coagulação do plasma humano normal = 30,8 s) na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após a sulfatação em C-6 da unidade A, o tempo de APTT passou para >300 s nesta mesma concentração. Portanto, a presença de sulfato em C-6 da unidade A de κ -carragenanas é importante para a atividade anticoagulante (ARAÚJO *et al.*, 2013).

Já a i -carragenana, cuja diferença estrutural com a κ -carragenana é a presença adicional de sulfato em C-2 das unidades B, possui atividade pró-coagulante em concentrações acima de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ARAÚJO *et al.*, 2013).

As macroalgas pardas produzem polissacarídeos sulfatados denominados fucanas, os quais também possuem atividade anticoagulante. As fucanas sulfatadas são um grupo de polissacarídeos constituídos por uma cadeia principal de fucose ligadas 1 \rightarrow 2 ou 1 \rightarrow 3. Essas unidades de fucose podem ser não sulfatadas, mono

ou dissulfatadas. Ainda, as fucanas podem apresentar pontos de ramificação por unidades de ácido glucurônico, manose ou galactose. A atividade anticoagulante de fucanas sulfatadas tem sido atribuída à presença de unidades 1→3 ligadas monosulfatadas em C-4 e dissulfatadas em C-2/C-4 (NISHINO *et al.*, 1991; NISHINO; TAKABE; NAGUMO, 1994; MOURÃO *et al.*, 1996).

Polissacarídeos obtidos de macroalgas verdes com diferentes estruturas químicas também apresentam atividade anticoagulante. No entanto, estes polímeros são ainda menos estudados, tanto em relação à estrutura química quanto as suas atividades biológicas, quando comparados com os polissacarídeos biossintetizados pelas macroalgas vermelhas e pardas.

Ramnanas sulfatadas obtidas de macroalgas verdes do gênero *Monostroma* apresentaram atividade anticoagulante. Estudos de estrutura química mostram que as macroalgas deste gênero biossintetizam ramnanas sulfatadas formadas majoritariamente por unidades de ramnose 2-ligada, as quais podem estar mono ou dissulfatadas (MAO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008). Destaca-se que a presença de unidades dissulfatadas, assim como observado para as fucanas das macroalgas pardas, pode contribuir para a atividade anticoagulante (CIANCIA; QUINTANA; CERREZO, 2010).

Foram extraídas da macroalga verde *M. latissimum*, ramnanas sulfatadas contendo 21% de grupos sulfato, 11% de ácidos urônicos e Mw de 725,4 kDa. A análise de metilação mostrou que a cadeia principal deste polissacarídeo é formada majoritariamente por ramnose 2- e 3-ligadas, sendo que estas unidades podem estar mono ou dissulfatadas. As ramnanas sulfatada de *M. latissimum* mostraram potente atividade anticoagulante *in vitro*, apresentando tempo de APTT de >200 s na concentração de 100 µg.mL⁻¹. Neste mesmo trabalho, os polissacarídeos nativos foram depolimerizados utilizando H₂O₂. Foi observado que a atividade anticoagulante manteve-se até um Mw de 61,9 kDa. Portanto, a atividade anticoagulante destes polímeros depende, além de fatores estruturais, da massa molar (ZHANG *et al.*, 2008).

Também foi observada potente atividade anticoagulante para as ramnanas sulfatadas (34,4% de sulfato) obtidas da macroalga *M. nitidum* (MAO *et al.*, 2008). A análise de metilação mostrou que os polissacarídeos desta alga são formados

majoritariamente por unidades ramnose 2-ligada 3,4-sulfato. Esta ramnana apresentou um tempo de APTT de 200 s na concentração de 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Diferentemente, foi isolado da macroalga *M. angicava* ramnanas sulfatadas (26,6% de sulfato) de M_w de 88,1 kDa as quais são formadas por uma cadeia principal de ramnose 2-, 3-, 2,3-ligada e 2-ligada 3-sulfato. Estes polissacarídeos também mostraram atividade anticoagulante através da ativação do co-fator II da heparina. No entanto, esta atividade foi menor quando comparada com os polissacarídeos obtidos de *M. nitidum* e *M. latissimum* (LI *et al.*, 2017).

2.8 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS

Quando em solução, as cadeias poliméricas podem se apresentar como esferas compactas, emaranhados ao acaso, bastões ou hélices. A conformação que um polímero adota em solução depende do solvente, da temperatura e da sua estrutura química primária (LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001; PICOUT; ROSS-MURPHY, 2007).

Portanto, modificações químicas de polissacarídeos podem provocar mudanças nos parâmetros conformacionais destes polímeros, tais quais raio de giro, raio hidrodinâmico, comprimento de persistência e viscosidade.

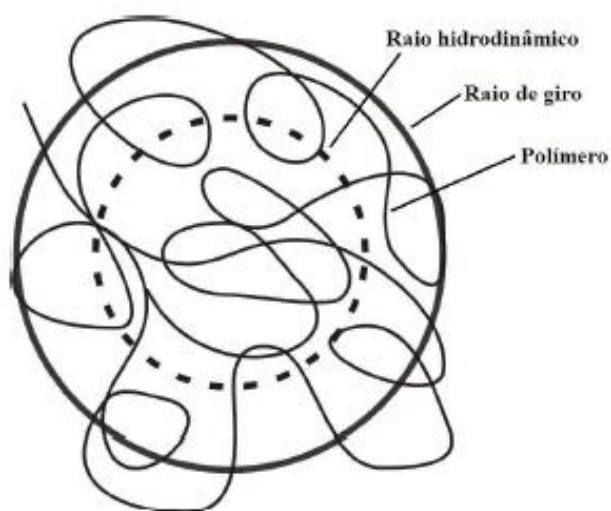
2.8.1 Raio de giro e raio hidrodinâmico

O raio de giro (R_g^2 ou $\langle S^2 \rangle$) de uma molécula está relacionado com o seu tamanho e representa as médias das distâncias entre o centro de gravidade de uma molécula e a sua superfície (REED, 1995; LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001).

O raio hidrodinâmico (R_h) representa o raio de uma esfera hipotética, impenetrável ao solvente, que ocupa o mesmo volume da cadeia polimérica. Ambos os parâmetros podem ser obtidos através de análises de espalhamento de luz laser.

O R_g pode ser obtido também através de análises viscosimétricas (REED, 1995). A relação entre raio de giro e raio hidrodinâmico está representada na figura 13.

FIGURA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE RAO DE GIRO E RAO HIDRODINÂMICO



FONTE: Giacomelli (2008)

Para a oxidação com periodato de alginatos e quitosanas é relatado uma diminuição no R_g destes polímeros, a qual é atribuída à depolimerização provocada por esta reação (ANDRESEN; PAINTER; SMIDSRØD, 1977; GOMEZ; RINAUDO; VILLAR, 2006; CHRISTESEN; VOLD; VARUM, 2008).

2.8.2 – Comprimento de persistência

O comprimento de persistência (L_p), é um parâmetro que está relacionado com a rigidez da cadeia polimérica. É expresso em nm e representa o tamanho do segmento rígido da molécula (REED, 1991).

É obtido através da equação:

$$\langle Rg^2 \rangle = \frac{LL_p}{3} - L_p^2 + \frac{2L_p^3}{L} - \left(\frac{2L_p^4}{L^2} \right) \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{L_p}\right) \right]$$

Onde Rg^2 é o raio de giro ao quadrado e L é o comprimento de contorno do polímero, o qual pode ser obtido pela equação:

$$L = n_i l$$

Sendo n_i o grau de polimerização e l é o tamanho da unidade repetitiva.

Os valores de L_p podem variar desde 1,3 nm para polímeros mais flexíveis como a pulanana até 120 nm para polissacarídeos de cadeia mais rígida, como a xantana (BULIGA, BRANT, 1987; ZHANG *et al.*, 2001).

Alginatos são polímeros de cadeia semi-flexível com L_p em torno de 12 nm. A oxidação com periodato para alginatos reduziu este valor de 4-5 nm, diminuindo, portanto, a rigidez da cadeia polimérica (CHRISTENSEN; VOLD; VÅRUM, 2008).

2.8.3 Viscosidade

Soluções poliméricas apresentam tempo de escoamento maior quando comparado com o solvente puro, ou seja, elas apresentam uma resistência ao fluxo. Esta resistência é causada pelo atrito entre as moléculas e é denominada viscosidade (REED, 1995; LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001).

Quando a viscosidade é extrapolada para a concentração zero, é obtido o valor de viscosidade intrínseca, a qual está relacionada com o volume hidrodinâmico ocupado por uma molécula isoladamente, representa o inverso da densidade do polímero em solução, sendo expressa em $dL.g^{-1}$.

A viscosidade intrínseca pode ser relacionada com a massa molar do polímero através da equação de Mark-Houwink-Sakurada (PICOUT; ROSS-MURPHY, 2007).

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Os valores de K e α podem ser determinados experimentalmente através de um gráfico que mostra o incremento da viscosidade intrínseca em função do aumento da massa molar do polímero. Neste gráfico, K é o coeficiente linear e α o coeficiente angular (FREITAS *et al.*, 2005).

K está relacionado com a flexibilidade da cadeia, enquanto que α reflete a geometria da cadeia ramificada, esfera, bastão, emaranhado ao acaso e a qualidade do solvente. (YOUNG, LOVELL, 1991; PICOUT, ROSS-MURPHY, 2007). A partir da viscosidade intrínseca é possível determinar o raio de giro viscosimétrico através da equação de Flory-Fox (FLORY, 1953):

$$[\eta] = \frac{\Phi_0 6^{3/2} R_g^3}{M_w}$$

Onde: Φ = parâmetro viscosimétrico; R_g = raio de giro (nm); M_w = massa molar média ponderal (g.mol^{-1}).

A oxidação com periodato para alginatos e quitosanas diminui a viscosidade intrínseca apresentada pelo polímero (CHRISTESEN; VOLD; VARUM, 2008). A diminuição deste parâmetro foi atribuída a menor massa molar dos produtos obtidos em relação ao polímero original. Diferentemente, o produto da oxidação com periodato para dextranas apresentou um aumento na viscosidade, mesmo com a redução da massa molar de 60,1 kDa para 25,4 kDa. O aumento da viscosidade foi atribuído à formação de hemiacetais (MAIA *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente trabalho é oxidar ulvanas de *Ulva fasciata* via periodato-clorito e caracterizar os produtos nativos e modificados quimicamente quanto a sua estrutura química, propriedades físico-químicas e potencial atividade anticoagulante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair ulvanas da alga verde *Ulva fasciata*.
- Caracterizar química e espectroscopicamente as ulvanas nativas.
- Carboxi-reduzir as ulvanas nativas.
- Oxidar ulvanas nativas com *meta*-periodato de sódio em diferentes tempos de reação visando obter derivados 2,3-dialdeídicos.
- Oxidar as ulvanas carboxi-reduzidas com *meta*-periodato, visando obter ulvanas carboxi-reduzidas 2,3-dialdeídicas.
- Reduzir as ulvanas 2,3-dialdeídicas com borohidreto de sódio.
- Oxidar os derivados 2,3-dialdeídicos com clorito de sódio visando obter derivados policarboxílicos.
- Dessulfatar as ulvanas nativas e policarboxílicas.
- Purificar o derivado policarboxílico com maior teor de grupos carboxila.
- Comparar a atividade anticoagulante *in vitro* dos produtos oxidados com a fração nativa.
- Determinar a massa molar média ponderada (M_w) das ulvanas nativas e dos produtos obtidos via oxidação periodato-clorito por análise de HPSEC-RI-LS-VIS.
- Determinar para as ulvanas nativas e modificadas quimicamente: viscosidade intrínseca, raio de giro viscosimétrico, comprimento de persistência e constante α , através da técnica de HPSEC-RI-LS-VIS.
- Determinar o pKa dos grupos ionizáveis presentes nas ulvanas nativas, dialdeídicas e policarboxílicas.

- Avaliar a afinidade das ulvanas nativas e dos produtos obtidos via oxidação periodato-clorito com os íons Na^+ e Ca^{2+} através da técnica de titulação potenciométrica.
- Comparar os espectros de RMN 1D e 2D obtidos para as ulvanas nativas e policarboxílicas na presença e na ausência de CaCl_2 .

4 JUSTIFICATIVA

O litoral brasileiro é rico em macroalgas do filo Chlorophyta, tendo sido descritas 167 espécies deste filo até 1999 (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Dentre estes organismos, as algas verdes do gênero *Ulva sp.*, são fontes de polissacarídeos sulfatados denominados ulvanas, os quais apresentam propriedades biológicas e físico-químicas de interesse para as áreas farmacêutica e biotecnológica (TOSKAS *et al.*, 2012; GADENNE *et al.*, 2013; MORELLI *et al.*, 2015; SHAO *et al.*, 2017; ALIPOUR *et al.*, 2018).

Devido ao caráter iônico (presença de grupos sulfato e carboxila) apresentado pelas ulvanas, estes polissacarídeos representam uma matéria-prima com potencial para a produção de novos agentes anticoagulantes. No entanto, as ulvanas apresentam um baixo efeito no tempo de coagulação sanguínea quando comparadas com outros polissacarídeos sulfatados (MAO *et al.*, 2006).

Neste contexto, destaca-se que modificações químicas de polissacarídeos podem potencializar as atividades biológicas destes polímeros, originando novos produtos de interesse biotecnológico. Além disso, as modificações químicas representam uma ferramenta na identificação das subestruturas essenciais para as propriedades apresentadas por estes polímeros (ARAÚJO *et al.*, 2013; SANTOS, 2015).

A presença de grupos sulfato é reconhecidamente fundamental para a atividade anticoagulante desempenhada por polissacarídeos. Para as ulvanas a sulfatação química originou ulvanas persulfatadas, as quais apresentaram o dobro de atividade anticoagulante quando comparado com a ulvana nativa (WANG *et al.*, 2013). A presença de grupos carboxila livre também é importante para esta atividade, conforme já observado para a heparina, quitina e carragenanas (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986; NISHIMURA, *et al.*, 1986; SANTOS, 2015).

Dentro deste contexto, a proposta do presente trabalho é avaliar o efeito do aumento do teor de grupos carboxila na atividade anticoagulante desempenhada pelas ulvanas. Com esta finalidade, no presente trabalho, ulvanas de *U. fasciata*

foram oxidadas via reação sequencial com periodato de sódio (NaIO_4) e clorito de sódio (NaClO_2).

A reação com periodato oxida hidroxilas *cis*-vicinais acarretando na formação de dois grupos aldeído em cada unidade monossacarídica oxidada e na ruptura da ligação C-C (GOLDSTEIN *et al.*, 1965). Estes grupos aldeído são passíveis de oxidação a ácidos carboxílicos através da reação com clorito de sódio (DALCANELE; MONTANARI, 1986).

Desse modo, o presente trabalho tem como foco principal a produção de derivados inéditos de ulvanas na forma policarboxílica com potencial uso como anticoagulante.

A heparina é o agente anticoagulante e antitrombótico comercial adotado na clínica médica. No entanto, a busca de novos compostos com esta atividade é necessária devido aos efeitos adversos provocados pela heparina, como trombocitopenia, hemorragia, além de risco de contaminação por patógenos de animais, uma vez que é obtida de pulmão de bovinos ou de intestino de suínos (LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009; MESTECHKINA; SMESTECHKINA, 2010).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DA ESPÉCIE ESTUDADA

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridaeplantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Família: Ulvaceae

Gênero: *Ulva*

Espécie: *Ulva fasciata* Delile

FIGURA 14 - EXEMPLAR DE *ULVA FASCIATA DELILE*



Fonte: GUIRY, 2017

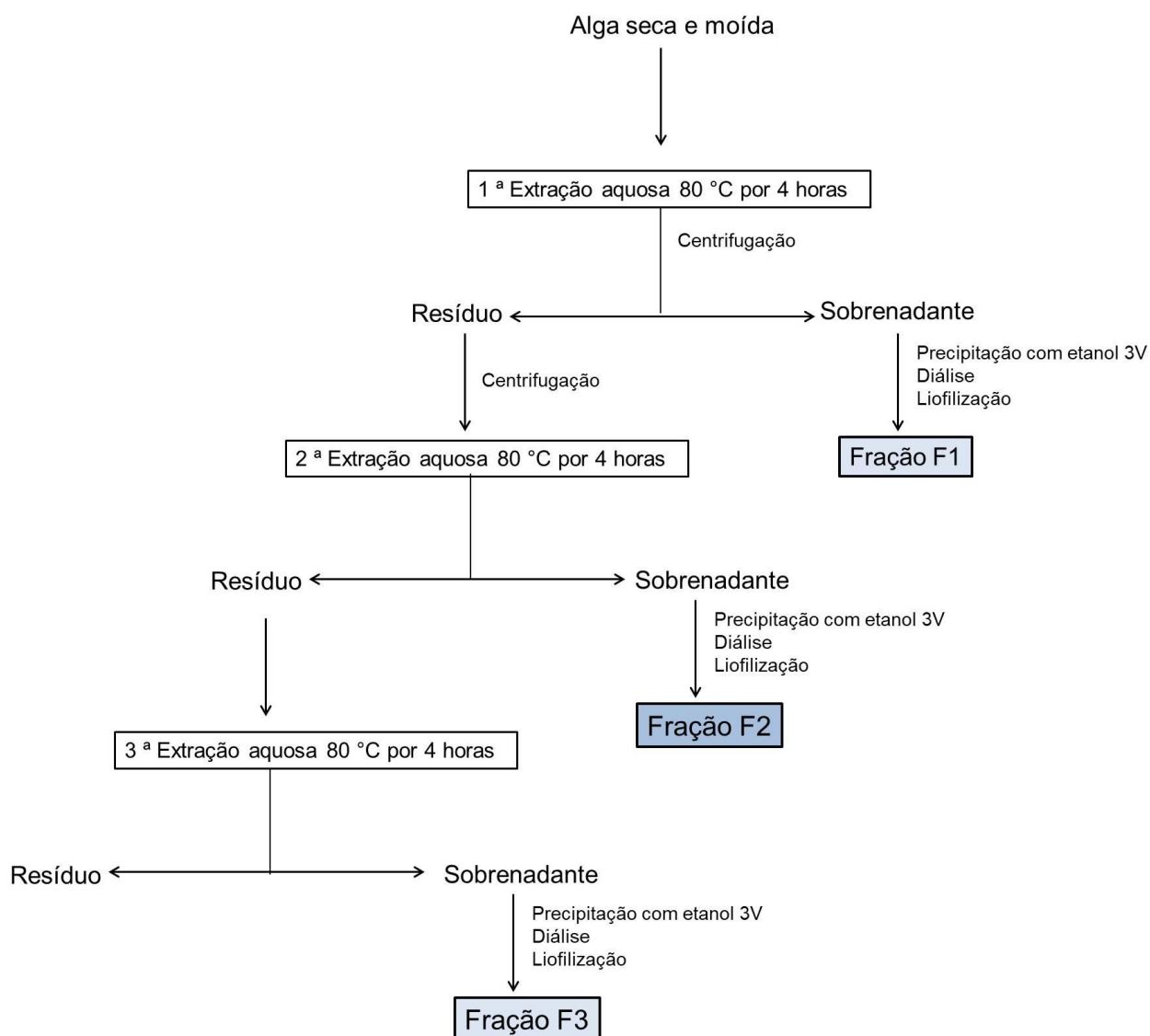
5.2 COLETA E PROCESSAMENTO

Os exemplares da alga verde *Ulva fasciata* Delile (Clorophyta) foram coletados em Bombinhas-SC e identificados pela Profa. Dra. Franciane Maria Pellizzari (UNESPAR, Paranaguá-PR).

5.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA *Ulva fasciata*

Os exemplares da alga verde *Ulva fasciata* foram secos em estufa a 50 °C, moídos em moinho de faca e então submetidos à extração aquosa (6% m/v) a 80 °C sob agitação mecânica. Após centrifugação, ao sobrenadante foi adicionado etanol (3 volumes) e acetato de potássio. O precipitado etanólico foi ressolubilizado em água, concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo, dialisado sequencialmente (membrana de 12-14 kDa) contra NaCl 1 mol.L⁻¹ (16 h), água destilada (até que a condutividade da água dialisada fosse igual a da água destilada) e liofilizado, originando a fração polissacarídica F. O resíduo de alga foi submetido a mais duas extrações aquosas, como descrito acima, originando assim as frações F2 e F3. A fração polissacarídica F2 foi utilizada nas modificações químicas descritas neste trabalho, enquanto que as frações F e F3 foram destinadas a outros projetos. O fluxograma da extração está representado na figura 15.

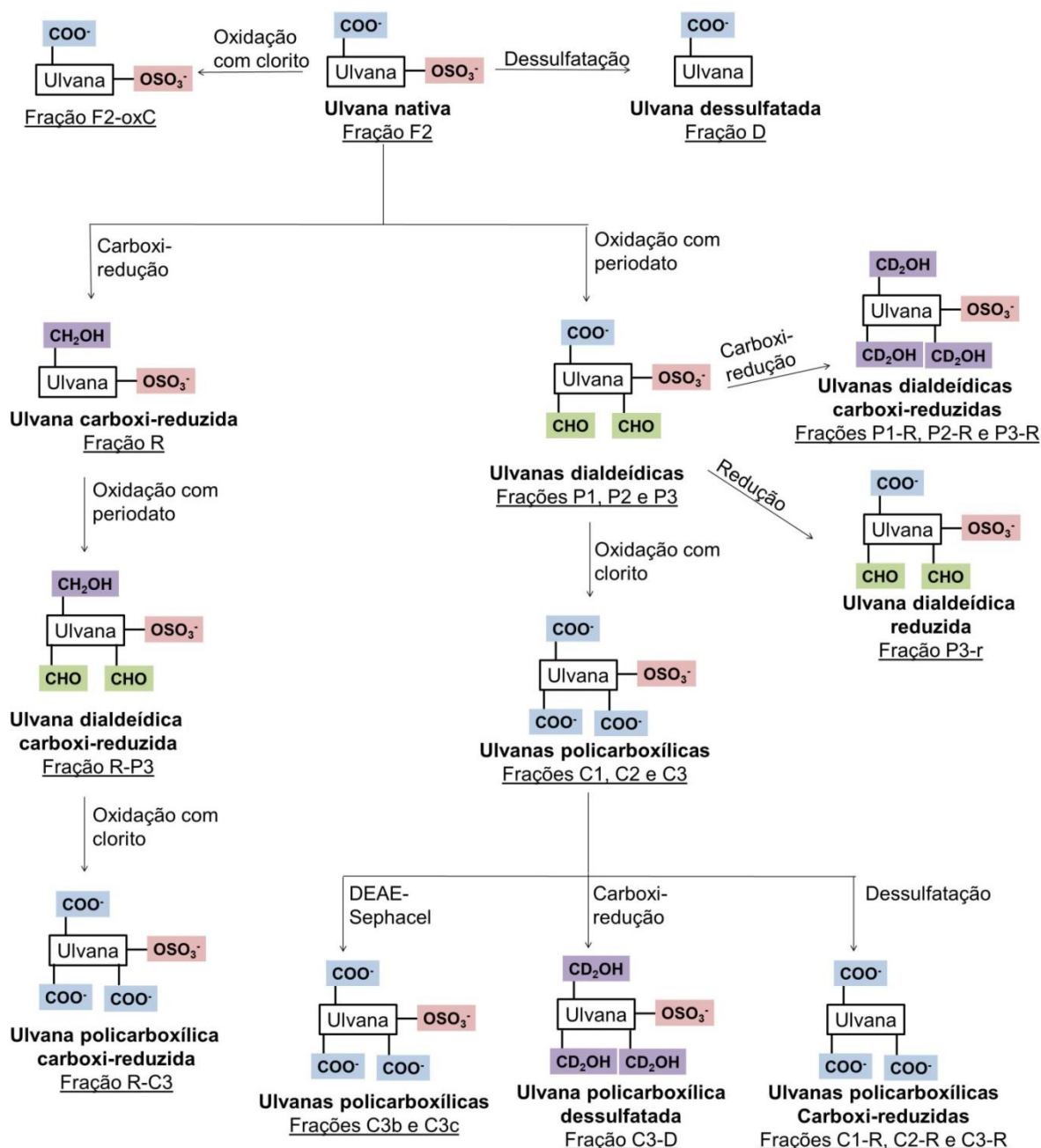
FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA DOS POLISSACARÍDEOS DE *U. FASCIATA*



5.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS ULVANAS

Um fluxograma das modificações químicas realizadas no presente trabalho, bem como as frações obtidas após estas reações está representado na figura 16.

FIGURA 16 - MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE ULVANAS DE *U. fasciata* REALIZADAS NO PRESENTE TRABALHO



5.4.1 Carboxi-redução da fração F2

O processo de carboxi-redução de F2 foi realizado de acordo com os métodos de Taylor e Conrad (1972) e Anderson e Stone (1985). Primeiramente, F2 foi solubilizada em tampão MES $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 4,75). Em seguida foi adicionado

vagarosamente carbodiimida [1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida] (CMC) na proporção de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de carbodiimida:50 μEq de carboxila. Após agitação por 1 hora, o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de tampão TRIS $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e adicionou-se NaBH_4 ou NaBD_4 até a obtenção de uma solução 2 mol.L^{-1} . Após 12 horas a 30°C , a solução foi neutralizada com ácido acético (1:1 v/v), dialisada (membrana 6 – 8 kDa) contra água destilada (até que a condutividade da água dialisada fosse igual a da água destilada) e liofilizada, obtendo-se a fração R.

5.4.2 Oxidação com *meta*-periodato de sódio para a fração F2 e R

A oxidação com periodato foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Goldstein *et al.*, 1965. F2 (3,3 g) foi solubilizada em 300 mL de água destilada. Posteriormente foram adicionados 300 mL de *m*- NaIO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (metaperiodato de sódio), obtendo-se uma concentração final de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de *m*- NaIO_4 . A solução permaneceu sob agitação magnética no escuro a 4°C . Decorrido o tempo de reação, foi adicionado 220 mL de etilenoglicol (para consumir o excesso de *m*- NaIO_4), e a solução foi dialisada sequencialmente (membrana de 6 – 8 kDa) contra NaCl 1 mol.L^{-1} e água destilada (até a condutividade da água dialisada fosse igual a da água destilada), congelada e liofilizada (GOLDSTEIN *et al.*, 1965). A reação de oxidação foi realizada nos tempos de 24, 48 e 72 horas, originando as frações P1, P2 e P3, respectivamente.

A ulvana R, obtida após a carboxi-redução da fração F2, foi submetida à oxidação com NaIO_4 por 72 horas conforme descrito acima, originando a fração R-P3.

5.4.3 Redução com NaBH_4 da fração P3

A fração P3 (415 mg em 63 mL de água) foi reduzida com NaBH_4 (622 mg) por 16 h. Decorrido o tempo de reação, a amostra foi neutralizada com ácido

acético:água 1:1 até pH próximo de 5,0, dialisada (6 - 8 kDa) e liofilizada, obtendo-se a fração P3-r.

5.4.4 Oxidação com clorito em escala analítica

A reação de oxidação com clorito foi realizada na presença de H_2O_2 e NaHPO_4 de acordo com Dalcanele e Montanari, 1986. Primeiramente, a fração P3 foi oxidada em escala analítica utilizando diferentes concentrações de NaClO_2 e diferentes temperaturas.

5.4.4.1 Efeito da variação do agente oxidante para a reação de oxidação de ulvanas dialdeídicas com NaClO_2

As reações foram realizadas utilizando 6 ou 8 equivalentes grama de NaClO_2 . O equivalente grama de NaClO_2 foi calculado usando a massa molar das díades que teoricamente seriam oxidadas com periodato: $[\rightarrow 4)\text{-UroA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha 3S-(1}\rightarrow)]$ e $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xyl-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha 3S-(1}\rightarrow)]$ (massa molar = 754 g).

A fração P3 (100 mg) foi solubilizada em água (4 mL) adicionando-se posteriormente NaH_2PO_4 (72,7 mg) e H_2O_2 (0,48 mL, 26 m/v). Uma solução de 6 (72,7 mg em 1 mL de água) ou 8 (95 mg em 1 mL de água) equivalentes grama de NaClO_2 foi adicionada gota a gota. A reação permaneceu sob agitação magnética por 2 h a 10 °C. Decorrido este tempo, foi adicionado Na_2SO_3 (265 mg) e a solução foi dialisada sequencialmente (membrana de 6-8 kDa) contra NaCl 1 mol.L⁻¹ (16 h) e água destilada (até que a condutividade da água dialisada fosse igual da destilada).

5.4.4.2 Efeito da temperatura do meio reacional para a reação de oxidação de ulvanas dialdeídicas com NaClO_2

P3 (100 mg) foi solubilizada em água (4 mL) adicionando-se posteriormente NaH_2PO_4 (72,7 mg) e H_2O_2 (0,48 mL, 26 %). Uma solução de 6 equivalentes grama de NaClO_2 (72,7 mg em 1 mL de água) foi adicionada gota a gota. A reação permaneceu sob agitação magnética por 2 h a 30 °C. Decorrido este tempo, foi adicionado Na_2SO_3 (265 mg) e a solução foi dialisada sequencialmente (membrana de 6-8 kDa) contra NaCl 1 mol.L⁻¹ (16 h) e água destilada (até que a condutividade da água dialisada fosse igual da destilada).

5.4.5 Oxidação com clorito das frações P1, P2, P3 e R-P3 em escala preparativa

A oxidação com clorito foi realizada de acordo com Dalcanele e Montanari, 1986. Separadamente, P1, P2 e P3 (1 g) foram solubilizadas em água (40 mL) adicionando-se posteriormente NaH_2PO_4 (727 mg) e H_2O_2 (4,8 mL, 26 m/v). Uma solução de 6 equivalentes grama de NaClO_2 (727 mg em 2 mL de água) foi adicionada gota a gota. As reações permaneceram sob agitação magnética por 2 h a 10 °C. Decorrido este tempo, foi adicionado Na_2SO_3 (2,6 g) e as soluções foram dialisadas sequencialmente (membrana de 6-8 kDa) contra NaCl 1 mol.L⁻¹ (16 h) e água destilada (até que a condutividade da água dialisada fosse igual da destilada). Em seguida, as soluções foram liofilizadas originando as frações de ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3.

A fração R-P3 (500 mg), obtida após a oxidação com periodato da ulvana carboxi-reduzida R, foi solubilizada em água (20 mL) adicionando-se posteriormente NaH_2PO_4 (364 mg) e H_2O_2 (2,4 mL, 26 m/v). Uma solução de 6 equivalentes grama de NaClO_2 (364 mg em 2 mL de água) foi adicionada gota a gota. A reação permaneceu sob agitação magnética por 2 h a 10 °C. Decorrido este tempo, foi adicionado Na_2SO_3 (1,3 g) e a solução foi dialisada sequencialmente (membrana de 6-8 kDa) contra NaCl 1 mol.L⁻¹ (16 h) e água destilada (até que a condutividade da

água dialisada fosse igual da destilada). Em seguida, a solução foi liofilizada originando a fração R-C3.

5.4.6 Dessulfatação das frações F2 e C3

O processo de solvólise das frações F2 e C3 foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridínio. Para formação deste sal, as amostras foram solubilizadas em água e então foi adicionada resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H^+ . Essa resina troca o Na^+ presente nos grupamentos sulfato desses polissacarídeos pelo íon H^+ , facilitando a formação do sal de piridínio. A amostra permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos, sendo então filtrada (pH do filtrado 1-2) e neutralizada (em capela) com piridina, até pH 7,0 e liofilizada (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

As frações na forma de sal de piridínio foram solubilizadas em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, na proporção de 89:10:1 (v/v), respectivamente, respeitando-se a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL da mistura (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

A solução resultante foi mantida a 100 °C durante 4 horas e decorrido esse tempo, dialisada contra água destilada (até que a condutividade da água dialisada fosse igual a da água destilada), congelada e liofilizada.

Os polissacarídeos dessulfatados obtidos a partir de F2 e C3 foram denominados D e C3-D, respectivamente.

5.5 FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL DA FRAÇÃO C3

A fração C3 (oxidada com periodato por 72 h e oxidada com clorito) foi submetida ao fracionamento em cromatografia de troca aniônica em coluna contendo DEAE-Sephacel na forma Cl^- . Primeiramente 560 mg de C3 foram solubilizados em 10 mL de água destilada. A solução foi centrifugada (10 minutos,

3500 rpm) e o sobrenadante foi adicionado à coluna e eluído com água destilada e concentrações crescentes de NaCl ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$; 1 mol.L^{-1} e $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$). A eluição de carboidratos na coluna foi monitorada pelo método de Dubois *et al.*, 1956. As subfrações obtidas foram dialisadas contra água destilada (até que a condutividade da água dialisada fosse igual a da água destilada) e liofilizadas. As subfrações resultantes foram identificadas como C3a (eluída em água), C3b (eluída em NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), C3c (eluída em NaCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) e C3d (eluída em $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$).

5.6 CARBOXI-REDUÇÃO DOS PRODUTOS OXIDADOS

Para a identificação e quantificação dos ácidos urônicos presentes em P1, P2, P3, C1, C2, C3 e C3c, estas frações foram carboxi-reduzidas com NaBD_4 , conforme descrito no 5.4.1 (página 61). As frações foram identificadas acrescentando a letra “R” depois dos seus nomes.

5.7 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

5.7.1 Carboidratos totais

As dosagens de carboidratos totais foram realizadas através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando como padrão uma solução $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ramnose. O método apresenta linearidade entre 10 – 50 μg de carboidrato. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Belphotonics modelo SP1105) no comprimento de onda de 480 nm.

5.7.2 Proteínas totais

As dosagens de proteínas totais foram realizadas pelo método de Lowry *et al.* (1951) utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu. O método apresenta linearidade

entre 5 – 100 µg de proteína. O padrão utilizado foi uma solução 1 mg.mL⁻¹ de BSA (albumina de soro bovino). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Belphotonics modelo SP1105) no comprimento de onda de 660 nm.

5.7.3 Grupos sulfato

Os teores de sulfato foram determinados pelo método de Dodgson e Price (1962), usando como reagente a mistura gelatina-bário. Primeiramente foi realizada a hidrólise total dos polissacarídeos com HCl 1M por 5 horas a 105°C, para liberação dos grupamentos sulfato. O sulfato em contato com o íon bário (adicionado na solução como BaCl₂) forma um composto insolúvel (BaSO₄) que se mantém em suspensão devido a presença da gelatina (Oxoid), sendo sua turbidez medida em espectrofotômetro. O padrão utilizado foi uma solução de sulfato de sódio (100 µg/100 µL) e as leituras realizadas em espectrofotômetro (Belphotonics modelo SP1105) no comprimento de onda de 360 nm. O método apresenta linearidade entre 20 – 200 µg de sulfato.

5.7.4 Ácidos Urônicos

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), utilizando o *m*-hidroxibifenila. O padrão utilizado foi uma solução de glucuronato de sódio (100 µg.mL⁻¹). O método apresenta linearidade entre 1 – 38 µg de ácidos urônicos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Belphotonics modelo SP1105) no comprimento de onda de 525 nm.

5.7.5 Polarimetria

A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{25^\circ}$) das amostras foi realizada na concentração de 0,2 g% em solução aquosa a temperatura de 25 °C,

utilizando cubetas de 10 cm de comprimento em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autopol III, no comprimento de onda de 589,3 nm.

5.7.6 Dosagem de grupos carboxila por titulação com NaOH

A determinação do teor de grupos carboxila (mmol.g^{-1}) foi realizada conforme Wei et al. (2015). Para tanto, as amostras (10 mg em 10 mL de $\text{HCl } 5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) foram titulados com uma solução de NaOH padronizada ($M = 7 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e a concentração de COOH (mmol.g^{-1}) foi calculada usando a seguinte equação:

$$[\text{COOH}] = \frac{(V_a - V_b) * M}{m} * 1000$$

Onde:

V_a e V_b = volume (L) usado para neutralizar a solução de $\text{HCl } 5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e a solução polissacarídica em $\text{HCl } 5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente, m = massa da amostra liofilizada (g) e M = molaridade da solução de NaOH.

5.8 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

5.8.1 Hidrólise ácida total, redução e acetilação

Para determinação da composição monossacarídica as frações (1 – 2 mg) foram submetidas à hidrólise ácida total com TFA 1 M por 4 horas a 100°C . Após essa etapa, os monossacarídeos obtidos foram reduzidos com NaBH_4 ou NaBD_4 por 15 horas a temperatura ambiente e neutralizados com ácido acético diluído, sendo seu excesso transformado em ácido bórico. Foi realizada co-destilação com metanol

(3x) para remoção do ácido bórico na forma de borato de metila. Os alditóis foram acetilados com anidrido acético (1 mL) em estufa a 120°C por 1 hora. Os acetatos de alditóis foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa CG-EM.

5.9 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo da marca VARIAN 3800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25µm) DB-225 MS (Durabond), e um espectrômetro de massa do tipo IonTrap, marca Varian Saturn 2000R. A temperatura do injetor foi ajustada em 250 °C e a temperatura inicial do forno em 50 °C, seguido de aumento gradual de 40 °C por minuto, até 220 °C, mantendo-se constante a partir de 25 minutos. Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons de 70 eV, observando-se os valores de m/z (relação massa/carga).

Os cromatogramas foram analisados e integrados em software Saturn Workstation 5.1. Esse método foi utilizado para quantificação relativa de acetatos de alditóis, sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976).

5.10 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas usando um espectrofotômetro FT-IR ALPHA com transformada de Fourier da Bruker. As amostras (2 mg) foram colocadas diretamente em contato com o laser e o espectro foi adquirido instantaneamente e analisado utilizando o software OPUS viewer (Bruker).

5.11 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ^{13}C (31,45 ppm) quanto para ^1H (2,225 ppm). As análises foram realizadas na temperatura de 70 ou 50 °C.

5.11.1 Técnicas de RMN monodimensionais

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas um total de 4.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram solubilizadas em D_2O , na concentração de aproximadamente 80 mg.mL^{-1} .

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz. As frações foram solubilizadas em D_2O , congeladas e liofilizadas (esse processo foi repetido duas vezes). As amostras foram solubilizadas em D_2O pura (30 mg.mL^{-1}). Os espectros foram analisados com o auxílio dos programas TOPSPIN 3.1 e ACD/NMR Processor.

5.11.2 Técnicas de RMN bidimensionais

As condições de aquisição dos espectros de RMN bidimensionais (HSQC, COSY, TOCSY e HMBC) foram utilizadas conforme descritas no manual da Bruker. A resolução dos espectros foi de 1024 (F2) x 512 (F1) K, com janela espectral de 4085 (F2) x 15923 (F1) Hz. Os espectros foram analisados com o auxílio dos programas TOPSPIN 3.1 e ACD/NMR Processor.

5.12 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *in vitro*

A atividade anticoagulante das frações nativas e modificadas quimicamente foi avaliada pelos testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT), tempo de protrombina (PT) e tempo de trombina (TT). Os testes foram realizados no coagulômetro COAG-A-MATE XM da marca Organon Técnica, utilizando plasma ovino. Como controle positivo de coagulação (determinação do tempo normal de coagulação) foi utilizada a salina 0,9% (em água ultrapura) e como controle negativo de coagulação foi utilizada a heparina não fracionada (calbiochem, 100 KU, 2.5×10^3 g.mol⁻¹; 10 µg.mL⁻¹).

5.12.1 Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)

Para o teste de APTT, foram incubados 100 µL de plasma com 100 µL de solução salina (controle) ou amostra (0-150 µg de polissacarídeo/mL) ou heparina, a 37 °C por 1 minuto, seguido de 100 µL de cefalina de coelho e re-incubação por 2,5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 100 µL de cloreto de cálcio 0,025 M, para iniciar a coagulação. O tempo de coagulação foi determinado em quadriplicata para cada concentração. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 300 s.

5.12.2 Tempo de protrombina (PT)

Para o teste de PT, foram incubados 100 µL de plasma com 100 µL de solução salina (controle) ou amostra (0-150 µg de polissacarídeo/mL), ou heparina a 37 °C por 1 minuto. Em seguida, 200 µL pré-aquecidos de reagente comercial para ensaio de PT foram adicionados para iniciar a coagulação. O tempo de coagulação foi determinado em quadriplicata para cada concentração. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 100 s.

5.12.3 Tempo de trombina (TT)

Para realizar o ensaio de TT, foram incubados 100 μL plasma com solução salina ou amostra (0 - 150 μg de polissacarídeo/ mL), ou heparina a 37 °C por 1 minuto a 37 °C. Então, 200 μL pré-aquecidos (37 °C) de reagente comercial para o ensaio de TT foram adicionados. O tempo de coagulação foi determinado em quadruplicata para cada concentração. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 100 s.

5.13 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO DE ALTO DESEMPENHO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI), ESPALHAMENTO DE LUZ LASER EM ÂNGULO RETO (90°) E EM ÂNGULO BAIXO (7°) E DETECTOR VISCOSIMÉTRICO (SEC-IR-LS-VIS)

A análise por cromatografia de exclusão por tamanho de alto desempenho foi realizada a 25 °C usando um sistema multi-detector da Viscotek-HPSEC equipado com uma coluna OH-Pack Shodex SB- 806 M HQ com limite de exclusão de $2 \times 10^7 \text{ g.mol}^{-1}$. O sistema multi-detector consistia em um detector de espalhamento de luz a 90° e 7°, a um detector de índice de refração (RI) Viscotec model (VE3580) e um viscosímetro.

Foi utilizado como eluente nitrato de sódio 0,1 mol.L^{-1} contendo 200 ppm de azida. Os polissacarídeos foram dissolvidos no eluente a 1 mg.mL^{-1} e filtrados em membrana de celulose de poro de 0,22 μm antes da injeção. Os resultados foram analisados pelo software OmniSEC (Malvern. Co., USA).

A partir desta análise foi possível determinar o M_n , o M_w , a dispersão ($\bar{D} = M_w/M_n$), a viscosidade intrínseca o raio de giro (R_g) via equação de Flory-Fox, o comprimento de persistência (L_p) e o expoente α da equação de Mark-Houwink-Sakurada.

5.14 Titulações potenciométricas

As titulações potenciométricas foram realizadas para as frações F2, P3 e C3 em um sistema Stabino® de análise de carga e tamanho de partículas. Neste teste, foi avaliado a variação do pH da solução polissacarídica em função da adição de soluções de HCl, NaCl e CaCl_2 .

5.14.1 Titulação com HCl

F2, P3 e C3 foram dissolvidas em água ultrapura na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o pH foi ajustado para 9,0 usando NaOH $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. Então, 4,5 mL de uma solução padronizada de HCl $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ foi adicionada gota a gota (30 μL a cada 10 s) e foi avaliado a variação do pH em função da concentração de HCl. Os pontos de inflexão da curva foram analisados pelo freeware Curtipot versão 4.2 (Gutz, 1992-2017).

5.14.2 Titulação com NaCl

F2, P3 e C3 foram dissolvidas em água ultrapura na concentração de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o pH foi ajustado para 7,0 usando NaOH $0,0035 \text{ mol.L}^{-1}$ (F2 e P3) ou $0,014 \text{ mol.L}^{-1}$ (C3). Então, 4,5 mL de NaCl 0,9% foram adicionados gota a gota (30 μL a cada 10 s) e foi avaliado a variação do pH em função da concentração de NaCl.

5.14.3 Titulação com CaCl_2

F2, P3 e C3 foram dissolvidas em água ultrapura ou salina 0,9% na concentração de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o pH foi ajustado para 7,0 usando NaOH $0,0035 \text{ mol.L}^{-1}$ (F2 e P3) ou $0,014 \text{ mol.L}^{-1}$ (C3). Então, 4,5 mL de CaCl_2 0,9% foram

adicionados gota a gota (30 μL a cada 10 s) e foi avaliado a variação do pH em função da concentração de CaCl_2 .

5.15 TRATAMENTO DE F2 E C3 COM DOWEX E CaCl_2

As frações F2 e C3 foram tratadas com resina DOWEX e CaCl_2 . As frações originadas a partir deste tratamento foram analisadas por RMN. F2 e C3 foram solubilizadas em água e então foi adicionado resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H^+ . A amostra permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 45 minutos, sendo então filtrada (pH do filtrado 1-2). O material filtrado foi dividido em dois frascos. O primeiro frasco foi liofilizado originando as frações F2-Dw e C3-Dw. Ao segundo frasco, foi adicionada uma solução de CaCl_2 0,9% (volume necessário para a concentração de 2mg de polissacarídeo para 1 mL de CaCl_2 0,9%). As soluções foram liofilizadas e as frações originadas após o tratamento com DOWEX e CaCl_2 foram denominadas F2-DwCa e C3-DwCa.

6 RESULTADOS

6.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS ULVANAS NATIVAS

Os polissacarídeos da alga verde *U. fasciata* foram obtidos a partir da alga seca e moída por extração aquosa a 80 °C originando a fração F2.

F2 foi caracterizada através de análises químicas e espectroscópicas (RMN 1D e 2D) com o objetivo de verificar se a sua estrutura química é compatível com o que é descrito na literatura para ulvanas de *Ulva sp.* (LAHAYE; RAY, 1996; QUEMENER; LAHAYE; BOBIN-DUBIGEON, 1997; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE, 1998; CASSOLATO, 2008; FREITAS *et al.*, 2105; COLODI, 2017). Estes resultados estão descritos a seguir.

6.1.1 Rendimento, análises químicas e composição monossacarídica da ulvana de *U. fasciata*

O rendimento e as análises químicas de F2 estão representados na tabela 1.

TABELA 1 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO F2

Fração	Rendimento (%) ^a	Carboidratos totais (%) ^b	Ácidos urônicos (%) ^c	Sulfato (%) ^d	Proteínas (%) ^e	[α] _D ²⁵
F2	10,0	66,3	22,4	20,6	3,9	-49,6

^a Em relação à alga seca e moída. ^b Dubois *et al.*, 1956. ^c Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^d Dodgson; Price, 1962. ^e Lowry *et al.*, 1951.

De acordo com as dosagens colorimétricas, F2 possui 66,3% de carboidratos totais, além de teores elevados de sulfato (20,6 %) e de ácido urônico (22,4 %). A presença de proteínas foi detectada em menor proporção (3,9 %). Portanto, F2 é constituída por polissacarídeos ácidos.

Para a quantificação dos monossacarídeos neutros presentes em F2, esta fração foi submetida ao processo de hidrólise ácida total, redução e acetilação e os

acetatos de alditol formados foram analisados por CG-EM. Este resultado está representado na tabela 2.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO F2

Fração	Monossacarídeos (mol%)				
	Rha	Xyl	Glc	Gal	Me-O-Gal ^a
F2	59,0	26,0	9,0	2,1	3,5

A análise de composição monossacarídica de F2 mostrou que esta fração é composta majoritariamente por ramnose e xilose. Ainda, foram identificadas menores proporções de glucose, galactose e 3- ou 4-metil-O-galactose, as quais foram atribuídas à presença de outras cadeias polissacarídicas.

O posicionamento do grupo metil na galactose foi determinado na análise de composição monossacarídica utilizando NaBD₄ na etapa de redução. A diferenciação entre 3-metil e 4-metil-O-galactose é realizada pela presença dos íons 130 e 129 respectivamente. Para F2, foi identificada a presença do íon 130, indicando que a galactose apresenta grupos O-metil em C-3.

Portanto, as análises químicas e a composição monossacarídica mostram que a fração F2 é formada por polissacarídeos sulfatados formados por unidades de ramnose, xilose e ácidos urônicos. Estes dados estão de acordo com o que é relatado na literatura para as ulvas de *Ulva* sp. (PERCIVAL; WOLD, 1963; LAHAYE; RAY, 1996; QUEMENER; LAHAYE; BOBIN-DUBIGEON, 1997; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE, 1998; TOSKAS *et al.*, 2011; FREITAS *et al.* 2015).

6.1.2 Carboxi-redução da fração F2

A presença de ácidos urônicos em polissacarídeos dificulta a determinação da composição monossacarídica, já que a ligação entre esta unidade e um

monossacarídeo neutro é mais resistente à hidrólise ácida. Esta resistência ocorre devido ao efeito indutivo que a carboxila exerce nas ligações glicosídicas próximas, dificultando a protonação do oxigênio destas ligações (BeMILLER, 1967).

Os ácidos urônicos podem ser convertidos em seus respectivos monossacarídeos neutros através do processo de carboxi-redução, o qual permite a hidrólise completa da cadeia polissacarídica e a correta quantificação dos monossacarídeos presentes (TAYLOR; CONRAD, 1972.) (Figura 17A).

Portanto, com o objetivo de quantificar os ácidos urônicos e os monossacarídeos neutros em conjunto, F2 foi submetida ao processo de carboxi-redução com NaBD₄. Na presença de NaBD₄, os monossacarídeos neutros provenientes dos ácidos urônicos apresentam duas unidades de massa a mais em relação aos monossacarídeos neutros pré-existentes no polissacarídeo. Isto pode ser observado pela análise de GC-MS através da presença dos íons 217 (proveniente da hexose) e 219 (proveniente dos ácidos urônicos) (Figura 17B). Essa diferenciação só é possível se, além da carboxi-redução com NaBD₄, na etapa de redução da composição monossacarídica também for usado NaBD₄.

A carboxi-redução de F2 originou a fração R, a qual segundo o método colorimétrico de dosagem de urônico (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991), apresentou 91,1% de redução dos ácidos urônicos em relação à fração original F2.

O rendimento, o teor de urônicos e a composição monossacarídica da fração R estão representados na tabela 3.

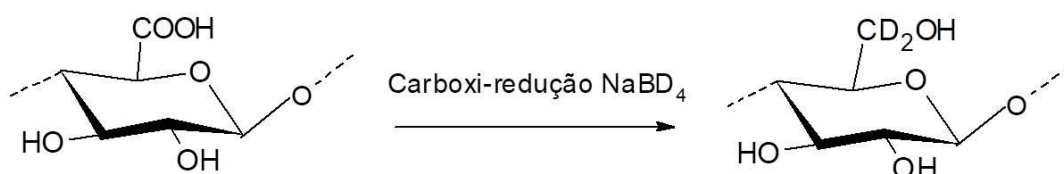
A fração R apresentou um aumento no teor de glucitol hexaacetato, em relação à fração F2, de 9,0 mol% para 23,0 mol %. Através da proporção dos íons 217 e 219 m/z foi possível observar que 83,9 mol% deste derivado corresponde a forma 1,6,6-trideutério glucitol hexaacetato. Portanto, a fração F2 contém 19,3 mol% de ácido glucurônico.

A análise de GC-MS também permitiu identificar a presença de 4,4 mol% do derivado 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose, a qual foi atribuída à presença de idose no polímero carboxi-reduzido. Durante a hidrólise ácida, a idose livre (proveniente da carboxi-redução do ácido idurônico) entra em equilíbrio com a forma 1,6-anidro-idose na proporção de 6,1:1,0 (COLINS; FERRIER, 1995). Deste modo é possível

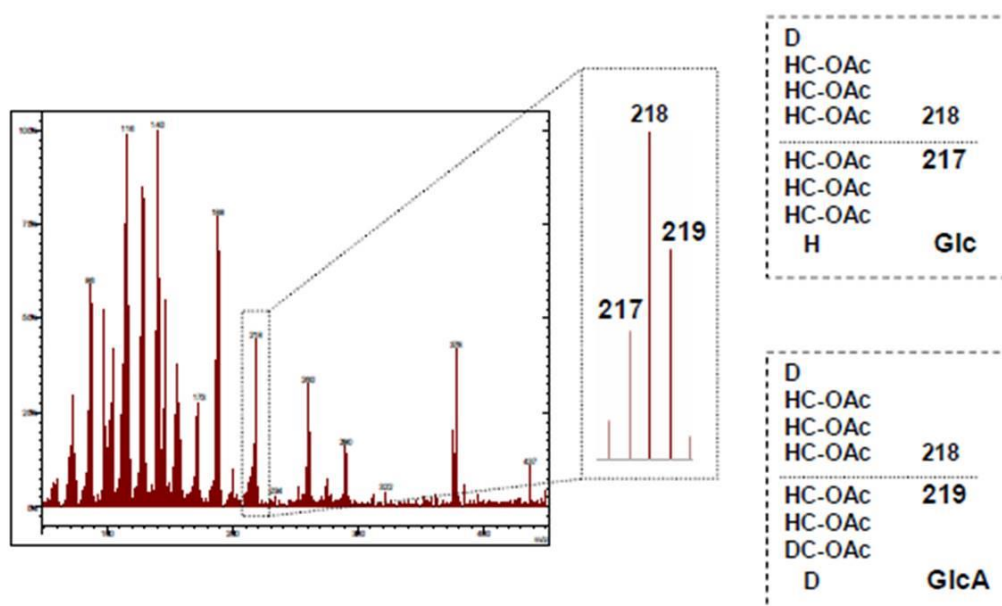
concluir que F2 e R contém 5,1% de ácido idurônico e idose respectivamente. O espectro de massa de 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose está representado na figura 18.

FIGURA 17 - CARBOXI-REDUÇÃO DE ÁCIDOS URÔNICOS. (A) FORMAÇÃO DE HEXOSE DEUTERADA. (B) FRAGMENTOS DE MASSA (GC-MS).

A



B



Fonte: Adaptado de Cassolato, 2008.

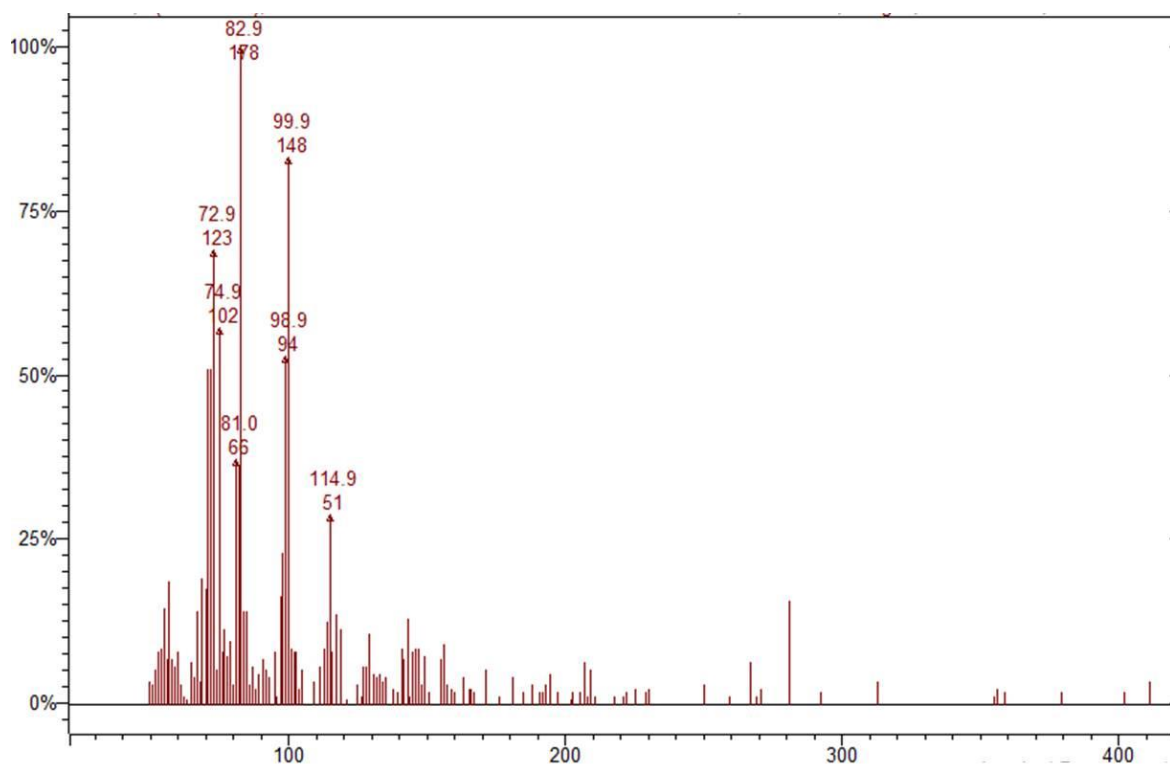
A composição monossacarídica, em termos de dos monossacarídeos neutros está de acordo com o que é relatado na literatura para as ulvanas de *U. fasciata* (QUEMENER; LAHAYE; BOBIN-DUBIGEON, 1997; LAHAYE *et al.*, 1999; CASSOLATO, 2008; FREITAS *et al.*, 2015; COLODI, 2017).

TABELA 3 - RENDIMENTO, TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA ULVANA NATIVA (F2) E CARBOXI-REDUZIDA (R)

Fração	Rendimento (%)	Ácidos urônicos (%) ^a	Monossacarídeos (mol %)						
			Rha	Xyl	Glc ^b	Glc ^c	Ido ^d	Gal	3-Me-O-Gal ^e
F2	10,0 ^f	22,4	59,0	26,0	9,0	n.d.	n.d.	2,1	3,5
R	70,0 ^g	2,0	50,4	18,0	3,7	19,3	5,1	1,5	1,7

n.d. = não determinado. ^a Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^b Identificado na forma de glucitol-hexaacetato (íon 217 m/z). ^c Identificado na forma de 1,6,6-trideutério-glucitol-hexaacetato (íon 219 m/z). ^d Identificado na forma de 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-iditol. ^e Identificado pela presença do íon 130 m/z. ^f Em relação à alga seca e moída. ^g Material recuperado após a carboxi-redução.

FIGURA 18 - FRAGMENTOS DE MASSA DO DERIVADO 2,3,4-TRI-O-ACETIL-1,6-ANIDRO-IDITOL OBTIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA



Os fragmentos estão de acordo com aqueles descritos por Colins; Ferrier (1995).

Fonte: O autor (2017)

6.1.3 ANÁLISES DE RMN DAS FRAÇÕES F2 e R

As frações F2 e R foram analisadas por RMN de ¹³C, ¹H e HSQC (Figuras 19 e 20). Os deslocamentos químicos das principais díades presentes nestas frações

foram assinalados de acordo com a literatura (LAHAYE; RAY, 1996; LAHAYE; BRUNEL; BONIN, 1997; LAHAYE; INIZAN; VIGOUROUX, 1998; LAHAYE, 1998; CASSOLATO, 2008; FREITAS *et al.*, 2015).

Na região anomérica do espectro de HSQC de F2, os acoplamentos em 101,1/4,82 e 104,4/4,64 foram atribuídos ao C-1/H-1 da ramnose 3-sulfato e ao β -D-ácido glucurônico respectivamente, formando a díade denominada A_{3s} (LAHAYE; RAY, 1996; LAHAYE; BRUNEL; BONIN, 1997).

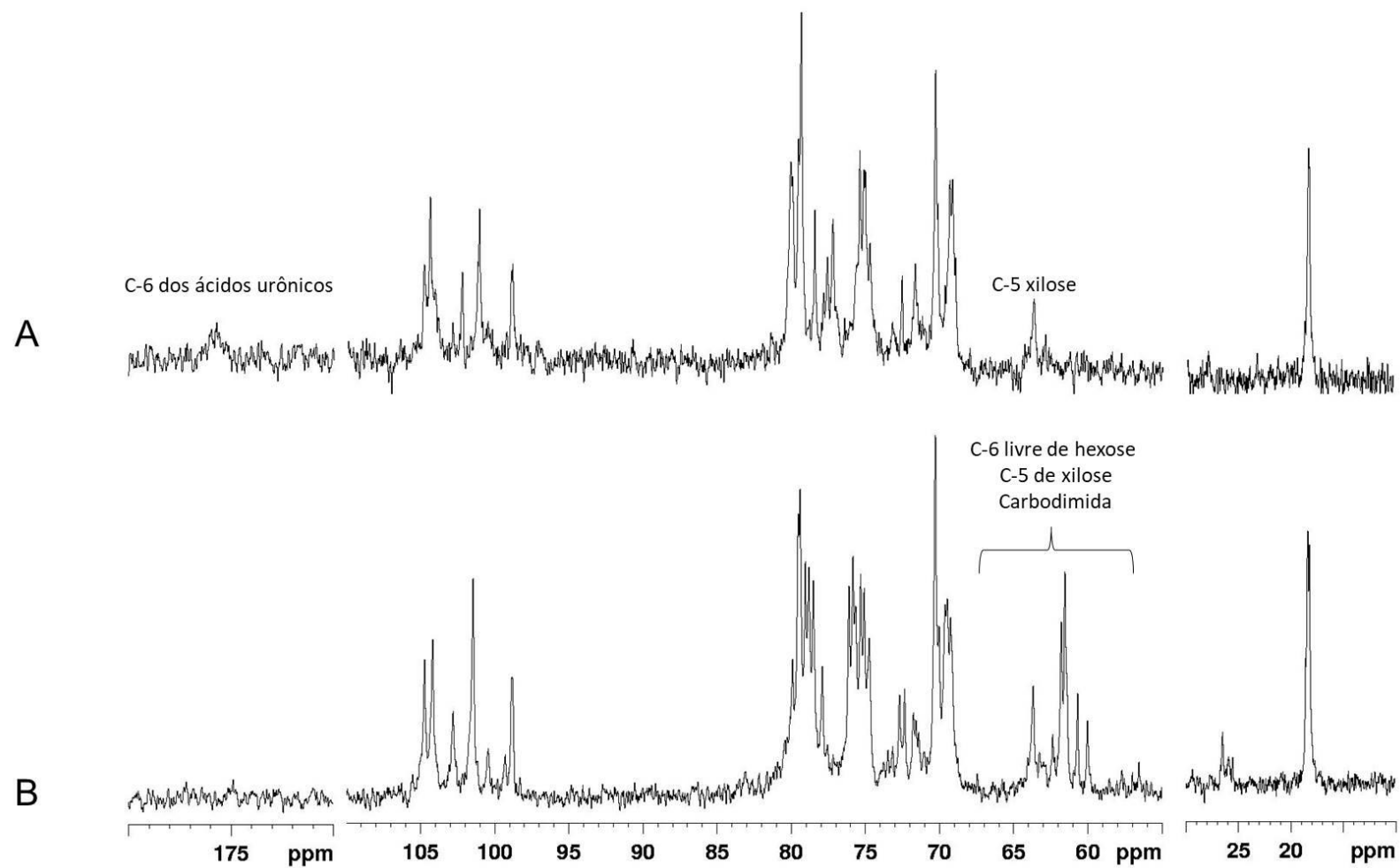
Adicionalmente, a região anomérica do espectro de HSQC de F2 apresentou acoplamentos referentes à díade U_{3s}: [\rightarrow 4)- β -D-Xyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rha-3S-(1 \rightarrow] (104,8/4,64 e 98,9/4,90 ppm); U_{2'3s}: [\rightarrow 4)- β -D-Xyl2S-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rha-3S-(1 \rightarrow] (100,5/4,97 e 99,3/4,92 ppm) e B_{3s}: ([\rightarrow 4)- α -L-IdoA-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rha-3S-(1 \rightarrow)] (104,1/5,13 e 102,2/4,91) (LAHAYE; BRUNEL; BONIN, 1997; LAHAYE; INIZAN; VIGOUROUX, 1998; LAHAYE, 1998). A correlação em 98,9/4,86 ppm foi atribuída à unidade ramnose entre β -D-xilose e β -D-xilose 2-sulfato (LAHAYE, 1998).

As correlações de HSQC da região do anel também foram determinadas de acordo com a literatura e estão representadas na tabela 4.

Após a carboxi-redução, o espectro de RMN de ^{13}C da fração R mostrou o desaparecimento do sinal do C-6 dos ácidos urônicos em ~175,3 ppm concomitante com o aparecimento de sinais entre 60-62 ppm, os quais foram atribuídos, em parte, ao C-6 livre das unidades de hexoses (Figura 19). Este dado está de acordo com a conversão dos monossacarídeos ácidos em seus respectivos monossacarídeos neutros. Portanto, a reação de carboxi-redução converteu as unidades de β -D-ácido glucurônico e α -L-idurônico em β -D-glucose e α -L-idose.

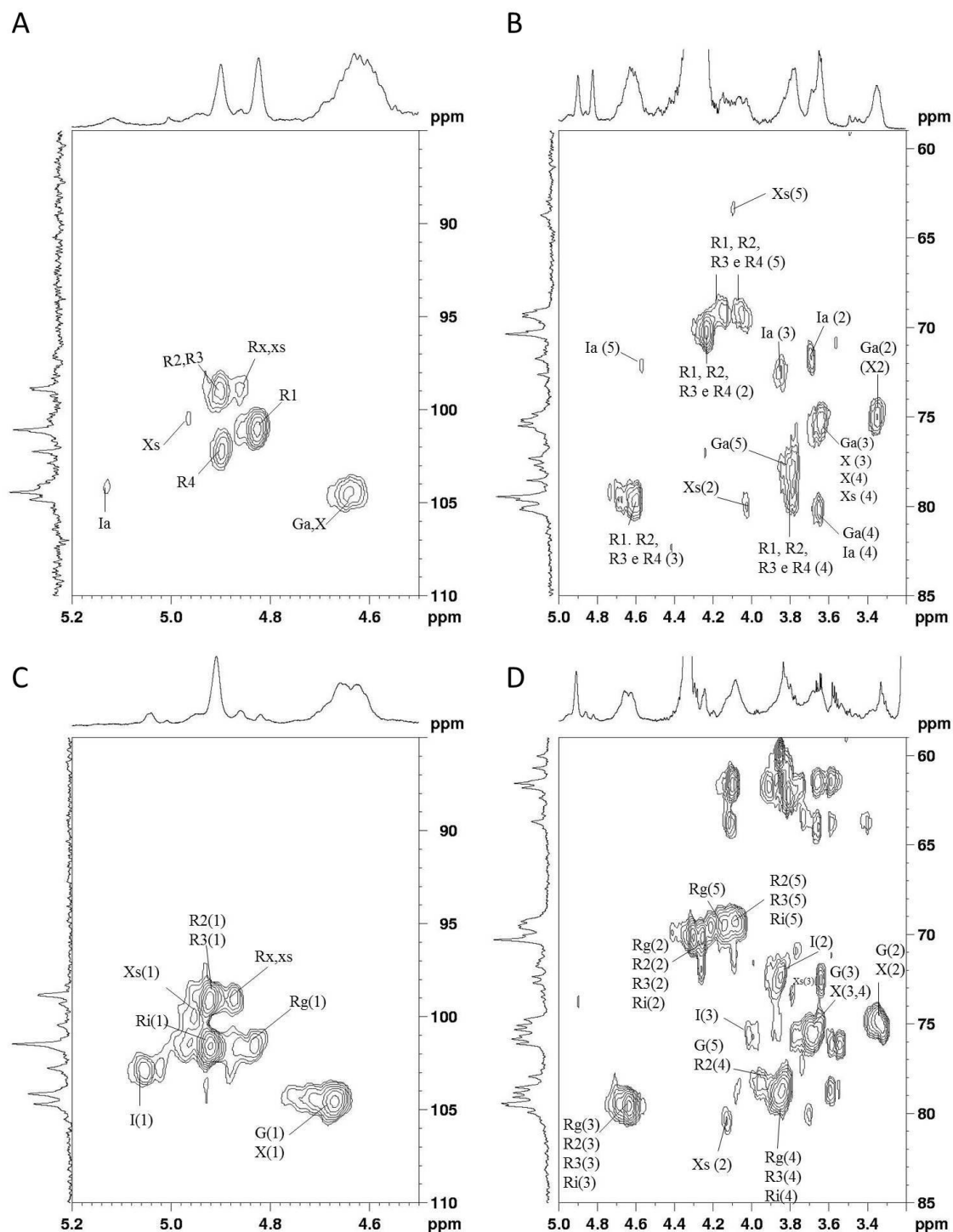
Ressalta-se ainda que o aumento na intensidade dos sinais na região de 60-62 ppm não pode ser atribuído somente à presença destas unidades, já que a intensidade destes sinais não é condizente com a porcentagem de hexoses presente na composição monossacarídica da fração R. Estes sinais também foram atribuídos à presença de carbodimida utilizada no processo de carboxi-redução. Este dado está de acordo com o previamente obtido por Cassolato (2008). O espectro de HSQC da fração R apresentou correlações referentes às díades U_{3s} e U_{2'3s} (Figura 20).

FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA ULVANA NATIVA F2 (A) E CARBOXI-REDUZIDA R (B)



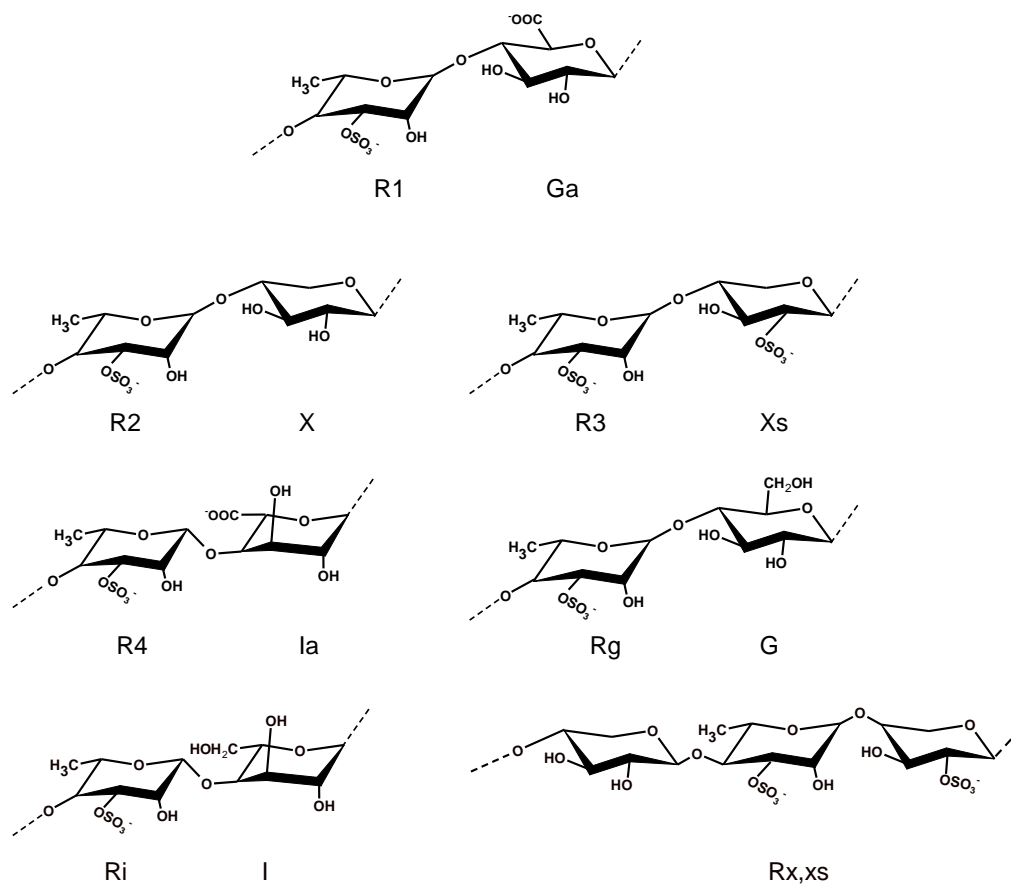
Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 20 - ESPECTRO DE HSQC DA ULVANA NATIVA F2 (A e B) E CARBOXI-REDUZIDA R (C e D)



NOTA: Solvente = D₂O. Temperatura = 70 °C. Acetona como padrão interno para ¹³C (31,45 ppm) e ¹H (2,225 ppm). Ga e R1 = β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de A_{3s}; X e R2 = β-D-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{3s}; Xs e R3= β-D-xilose 2-sulfato e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{2's,3s}; Ia e R4 = α-L-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B_{3s}, G e Rg = β-D-glucose e α-L-ramnose 3-sulfato de A_{3sCR} e I e Ri= α-L- idose e α-L-ramnose 3-sulfato de B_{3sCR}. R_{x,xs} = α-L-ramnose 3-sulfato entre β-D-xilose e β-D-xilose 2-sulfato. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

TABELA 4 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) NOS ESPECTROS DE RMN DA ULVANA NATIVA (F2) E CARBOXI-REDUZIDA (R)



Unidade	Diáde	C-1/H-1	C-2/H-2	C3-H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
Ga	A _{3s} ^a	104,4/4,64	75,2/3,35	75,5/3,65	80,1/3,65	77,0/3,79	~175,3
R1		101,1/4,82	70,4/4,24	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
X	U _{3s} ^{a,b}	104,8/4,64	74,8/3,35	75,3/3,65	75,5/3,65	63,7	
R2		98,9/4,90	70,4/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,2/4,05	~18,2/1,33
Xs	U _{2's,3s} ^{a,b}	100,5/4,97	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,77	63,1	
R3		99,3/4,92	70,3/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,4/4,05	~18,2/1,33
Ia	B _{3s} ^a	104,1/5,13	71,7/3,68	72,7/3,83	80,2/4,02	72,1/4,58	~175,3
R4		102,2/4,91	70,4/4,24	79,4/4,61	79,4/3,79	69,4/4,00	~18,2/1,33
G	A _{3sCR} ^b	104,1/4,72	75,3	75,9	78,9	76,1/3,79	60,0-62,0/n.i.
Rg		101,5/4,83	70,2/4,25	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
I	B _{3sCR} ^b	102,6/5,05	72,0/3,66	72,7/3,85	n.i	n.i	60,0-62,0/n.i.
Ri		101,5/4,92	70,2/4,25	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
Rx,xs	^{a,b}	98,9/4,86					

n.i. = não identificado. ^a Presente em F2. ^b Presente em R

A região anomérica do espectro de HSQC de R apresenta sinais em 104,1/4,72 e 101,5/4,83, correspondentes ao C-1/H-1 das unidades de glucose e ramnose 3-sulfato respectivamente. Os sinais dos carbonos da região do anel desta díade foram assinalados de acordo com Cassolato (2008). Adicionalmente, a correlações do C-1/H-1 da α -L-idose e da α -L-ramnose 3-sulfato adjacente a esta unidade foi assinalado em 102,6/5,05 e 101,5/4,92 ppm, respectivamente.

Os hidrogênios da região do anel foram assinalados de acordo com espectro de HSQC. Também no espectro de HSQC, correlação na região anomérica em 102,6/5,05 foi atribuída ao C-1/H-1 das unidades de idose. No espectro de TOCSY, o H-1 das unidades de idose em 5,05 ppm correlaciona com o H-2 e o H-3 em 3,66 e 3,85 ppm respectivamente (C-2 e C-3 em 72,0 e 72,7 respectivamente). As novas díades formadas contendo glucose e idose foram denominadas A_{3sCR} e B_{3sCR} respectivamente.

Desta maneira, as análises químicas e de RMN permitem concluir que as ulvanas nativas F2 são constituídas pelas díades A_{3s} , B_{3s} , U_{3s} e $U_{2's,3s}$, conforme já foi previamente descrito para ulvanas de *U. fasciata*. Já as ulvanas carboxi-reduzidas apresentaram as díades A_{3sCR} , B_{3sCR} , U_{3s} e $U_{2's,3s}$.

As frações F2 e R foram direcionadas aos estudos de modificação química via oxidação periodato-clorito, visando a obtenção de moléculas com atividade anticoagulante.

6.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F2 E R

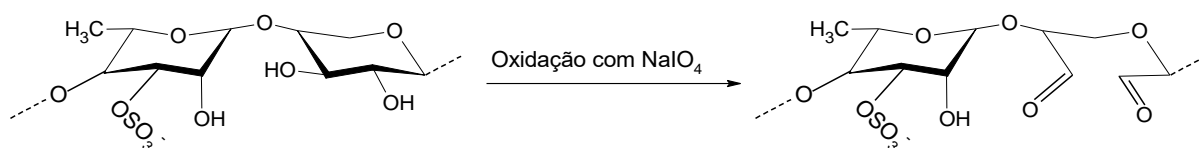
As frações F2 e R foram submetidas a reações de oxidação com $NaIO_4$ e $NaClO_2$. Outras modificações químicas a partir das ulvanas nativas e seus produtos oxidados foram realizadas, como, por exemplo, redução com $NaBH_4$, carboxi-redução e dessulfatação, com o objetivo de identificar os elementos estruturais necessários para a atividade anticoagulante das ulvanas nativas e oxidadas. A carboxi-redução também foi realizada com o objetivo de identificar e quantificar os ácidos urônicos presentes nas frações.

6.3. OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO F2 COM META-PERIODATO DE SÓDIO

A oxidação com periodato para as ulvanas nativas F2 foi realizada com o objetivo de obter ulvanas dialdeídicas. Esta reação promove a clivagem oxidativa de unidades que possuem hidroxilas vicinais, acarretando na quebra da ligação C-C e na formação de dois grupamentos aldeído em cada uma das unidades oxidadas (GOLDSTEIN *et al.*, 1965).

Considerando que as ulvanas são polissacarídeos constituídos majoritariamente por ligações glicosídicas do tipo 1→4, a reação com periodato oxidaria as unidades monossacarídicas contendo hidroxilas vicinais levando a ruptura da ligação C-C em C-2 e C3, originando unidades 2,3-dialdeídicas (Figura 21).

FIGURA 21 - EXEMPLO DE UMA DÍADE DE ULVANA PASSÍVEL DE OXIDAÇÃO COM NaIO_4

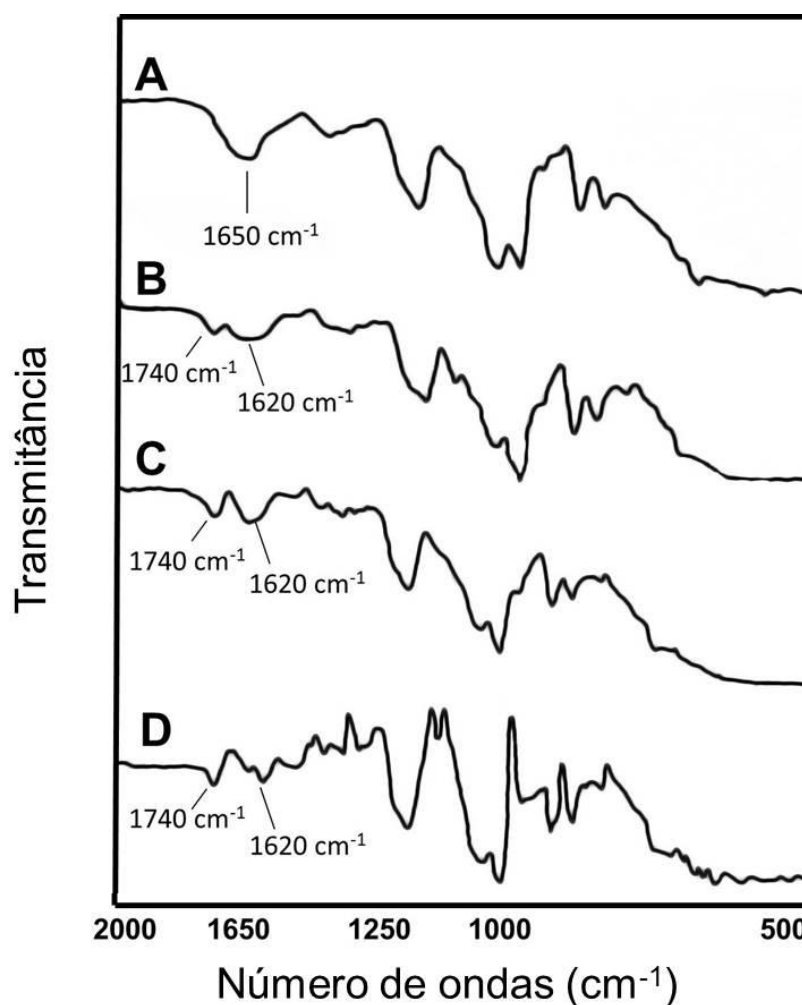


A fração F2 foi oxidada por 24, 48 e 72 horas, originando as frações P1, P2 e P3 respectivamente, as quais foram analisadas por FTIR (Figura 22).

A análise de FTIR mostrou que após a oxidação com periodato há o aparecimento da banda em 1740 cm^{-1} , a qual foi atribuída ao estiramento da carbonila dos grupos aldeídos. Portanto, a análise de FTIR indica que a oxidação com periodato foi efetiva e crescente com o tempo de oxidação (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIELME, 2006). Desta maneira, os produtos obtidos após a oxidação de F2 com periodato foram denominados ulvanas dialdeídicas.

A presença das bandas em 1650 e 1620 cm^{-1} nos espectros das ulvanas nativas e dialdeídicas respectivamente foram atribuídas à carbonila do grupo carboxila dos ácidos urônico e às ligações da água (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIELME, 2006).

FIGURA 22 - ESPECTRO DE FTIR DA ULVANA NATIVA F2 (A) E DE SEUS PRODUTOS P1 (B), P2 (C) E P3 (D) OBTIDOS APÓS A OXIDAÇÃO COM PERIODATO



6.3.1 Rendimento, análises químicas e composição monossacarídica das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3

O material recuperado, em relação ao material inicial submetido à oxidação foi de 88,0, 100,0 e 91,0% para P1, P2 e P3 respectivamente (Tabela 5).

A análise de carboidratos totais dos produtos oxidados mostrou uma diminuição no teor de carboidratos de 66,3% (F2) para 54,5 53,1 e 51,1% (P1, P2 e P3 respectivamente). Esse dado indica que após 72 horas de oxidação com periodato houve oxidação de aproximadamente 22,9% das unidades monossacarídicas presentes no polímero original.

Paralelamente à diminuição no teor de carboidratos totais, a determinação colorimétrica de ácidos urônicos mostrou que houve uma diminuição no teor de ácidos urônicos de 22,4% (F2) para 14,1, 13,8 e 12,5% para P1, P2 e P3, respectivamente. Portanto, 55,8% dos ácidos urônicos devem ser resistentes à oxidação com periodato, mesmo após 72 h de reação.

Os teores de grupo sulfato das frações oxidadas foram similares à F2, variando de 20,4 - 21,2%, indicando que a reação com periodato não afeta as unidades sulfatadas. A rotação óptica variou de -58,4 a -34,4. Todos os produtos obtidos após a oxidação com periodato apresentaram proteínas abaixo de 3,9%.

TABELA 5 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F2, P1, P2 E P3

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos totais (%) ^a	Ácidos urônicos (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Proteínas (%) ^d	[α] _D ²⁵
F2	10,0 ^e	66,3	22,4	20,6	3,9	-49,6
P1	88,0 ^f	54,5	14,1	20,4	2,0	-51,2
P2	100,0 ^f	53,1	13,8	21,0	2,4	-34,4
P3	91,0 ^f	51,1	12,5	21,2	3,0	-58,6

^a Dubois *et al.*, 1956. ^b Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^c Dodgson; Price, 1962. ^d Lowry *et al.*, 1951. ^e Em relação à alga seca e moída. ^f Material recuperado após a oxidação com periodato.

Para identificar as unidades monossacarídicas neutras resistentes à oxidação com periodato, as frações P1, P2 e P3 foram submetidas ao processo de hidrólise total e analisadas por GC-MS (Tabela 6). A análise demonstrou que houve um aumento no teor de ramnose em relação a F2 de 59 mol% para 64,6, 74,5 e 81,9 mol% para P1, P2 e P3, respectivamente. Este dado está de acordo com o esperado, desde que as unidades de ramnose são 4-ligadas-3-sulfato e, portanto, não apresentam hidroxilas vicinais.

Já os teores de xilose apresentaram uma diminuição em relação a F2 de 26 mol% para 18,7, 13,0 e 8,8 mol% para P1, P2 e P3 respectivamente. Este dado demonstra que após 72 horas de reação 33,8% das unidades de xilose ainda são resistentes à oxidação com periodato. Esta resistência foi atribuída, em parte, à

presença de unidades de β -D-xilose 4-ligadas-2-sulfatadas, as quais não possuem hidroxilas vicinais e, portanto, não são oxidadas com periodato.

Também foi identificada a presença de 3-metil-O-galactose e glucose para todas as frações, indicando que estas unidades monossacarídicas das ulvanas são resistentes à oxidação com periodato.

Considerando que as frações oxidadas apresentavam ácidos urônicos (Tabela 5), as frações P1, P2 e P3 foram carboxi-reduzidas de acordo com a metodologia de Taylor e Conrad (1972) originando as frações P1-R, P2-R e P3-R. O rendimento em relação ao material inicial submetido à carboxi-redução está descrito na tabela 6. Após o processo de carboxi-redução foi realizada a dosagem de ácidos urônicos pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), onde foi possível observar a conversão de 75,9, 85,5 e 87,2% dos ácidos urônicos a seus respectivos monossacarídeos neutros para as frações P1-R, P2-R e P3-R, respectivamente.

Com a finalidade de identificar e quantificar os ácidos urônicos presentes nas ulvanas oxidadas com periodato, as frações P1-R, P2-R e P3-R foram submetidas ao processo de hidrólise ácida total. Os produtos de hidrólise foram reduzidos com NaBD_4 , acetilados e analisados por GC-MS.

Não foi detectada a presença de 2,3,4-O-tri-acetil-1,6-anidro-idose dentre os derivados identificados por GC-MS. Este dado mostra que as unidades de ácido idurônico presentes na fração original (F2) são susceptíveis à oxidação com periodato.

De modo diferente, as frações P1-R, P2-R e P3-R apresentam teores do derivado 1,6,6-trideutério glucitol hexaacetato, entre 22,0-25,3 mol%, os quais correspondem nas frações originais às unidades de ácido glucurônico.

Deste modo, as unidades de β -D-ácido glucurônico presentes nas ulvanas são, pelo menos em parte, resistentes à oxidação com periodato, mesmo que apresentem requisitos para a oxidação (hidroxilas vicinais).

Para a oxidação com periodato do dermatan sulfato foi demonstrado que as unidades de β -D-ácido glucurônico são resistentes à oxidação com periodato,

mesmo que estas unidades apresentem hidroxilas vicinais. Em relação ao posicionamento destas hidroxilas, as unidades de ácido β -D-glucurônico usualmente adotam a conformação 4C_1 onde ambas as hidroxilas estão na posição equatorial e, portanto, seriam susceptíveis à oxidação com periodato (FRANSON, 1974).

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES P1, P2, P3 E DE SEUS PRODUTOS CARBOXI-REDUZIDOS

Fração	Rendimento (%)	Ácidos urônicos (%) ^a	Monossacarídeos (mol%)						
			Rha	Xyl	3-Me-O-Gal ^b	Gal	Glc ^c	Glc ^d	Ido ^e
F2	10,0 ^f	22,4	59,0	26,0	3,5	2,1	9,0	-	-
R	70,0 ^g	2,0	50,4	18,0	1,8	1,7	3,7	19,3	5,1
P1	88,0 ^h	14,1	64,6	18,7	1,7	-	15,0	-	-
P1-R	75,0 ^g	3,4	52,1	10,8	2,2	3,7	5,9	25,3	-
P2	100,0 ^h	13,8	74,5	13,0	2,6	1,5	8,5	-	-
P2-R	71,0 ^g	2,0	56,0	9,7	3,5	1,1	5,9	23,8	-
P3	91,0 ^h	12,5	81,9	8,8	3,3	Tr.	5,5	-	-
P3-R	86,0 ^g	1,6	61,3	8,0	2,8	2,2	3,7	22,0	-

- = Não detectado. ^a Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^b Identificado pela presença do íon 130 m/z. ^c Identificado na forma de glucitol-hexaacetato (íon 217 m/z). ^d Identificado na forma de 1,6,6-trideutério-glucitol-hexaacetato (íon 219 m/z). ^e Identificado na forma de derivado 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose. ^f Em relação à alga seca e moída. ^g Material recuperado após a carboxi-redução. ^h Material recuperado após a oxidação com periodato.

Para explicar a diferença na oxidação de ácidos urônicos no dermatan sulfato, Franson (1974) discute que pode haver formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila em C-6 e os grupos hidroxil em C-2 ou C-3, o que levaria a uma resistência a oxidação com periodato. Para o ácido α -L-idurônico a formação de ligações de hidrogênio envolvendo o C-6 da carboxila não é favorecida. Ainda, sua conformação é instável e depende do pH, da temperatura e da força iônica (FRANSON, 1974; PARADOSSI; CAVALIERI; CHIESSI, 2002).

6.3.2 Análise por RMN mono- e bidimensionais das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3

As frações P1, P2 e P3, obtidas após a oxidação com periodato foram analisadas por RMN de ^{13}C e ^1H . No espectro de RMN de ^{13}C destas frações foi possível observar o aparecimento dos sinais na região de 90,6-91,5 ppm, os quais são correspondentes aos carbonos dos grupos aldeído em C-2 e C-3 na forma de diol e/ou hemiacetal (Figura 23). Este dado está de acordo com o descrito por Senchenkova e colaboradores (1999) e por Gomez; Rinaudo; Villar (2007). Os hidrogênios destes grupos foram assinalados em 4,97, 5,06, 5,15 e 5,19 ppm (Figura 24). Em menor intensidade, foi observado no espectro de RMN de ^1H o sinal do hidrogênio dos grupos aldeído livres em 9,7 ppm (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

No espectro de RMN de ^{13}C das frações P1, P2 e P3 foi assinalado o C-1 das unidades de β -D-xilose 2-sulfato em 100,5 ppm (Figura 25). Esta unidade é resistente à oxidação com periodato como esperado, desde que não apresenta hidroxilas vicinais.

A identificação das novas díades formadas após a oxidação com periodato foi realizada através da análise de RMN por ^{13}C , ^1H , HSQC, TOCSY COSY e HMBC (Figuras 23-29). Os assinalamentos das unidades presentes nestas frações estão representados na tabela 7.

No espectro de HSQC (Figura 26) das ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3, a correlação anomérica em 105,7/4,79 ppm foi atribuída ao C-1/H-1 dos derivados 2,3-dialdeído xilose. Esta correlação está de acordo com o C-1/H-1 dos derivados de xilose obtidos após a oxidação com NaIO_4 e redução com NaBH_4 da região de *link* da heparina (ALEKSEEVA *et al.*, 2014).

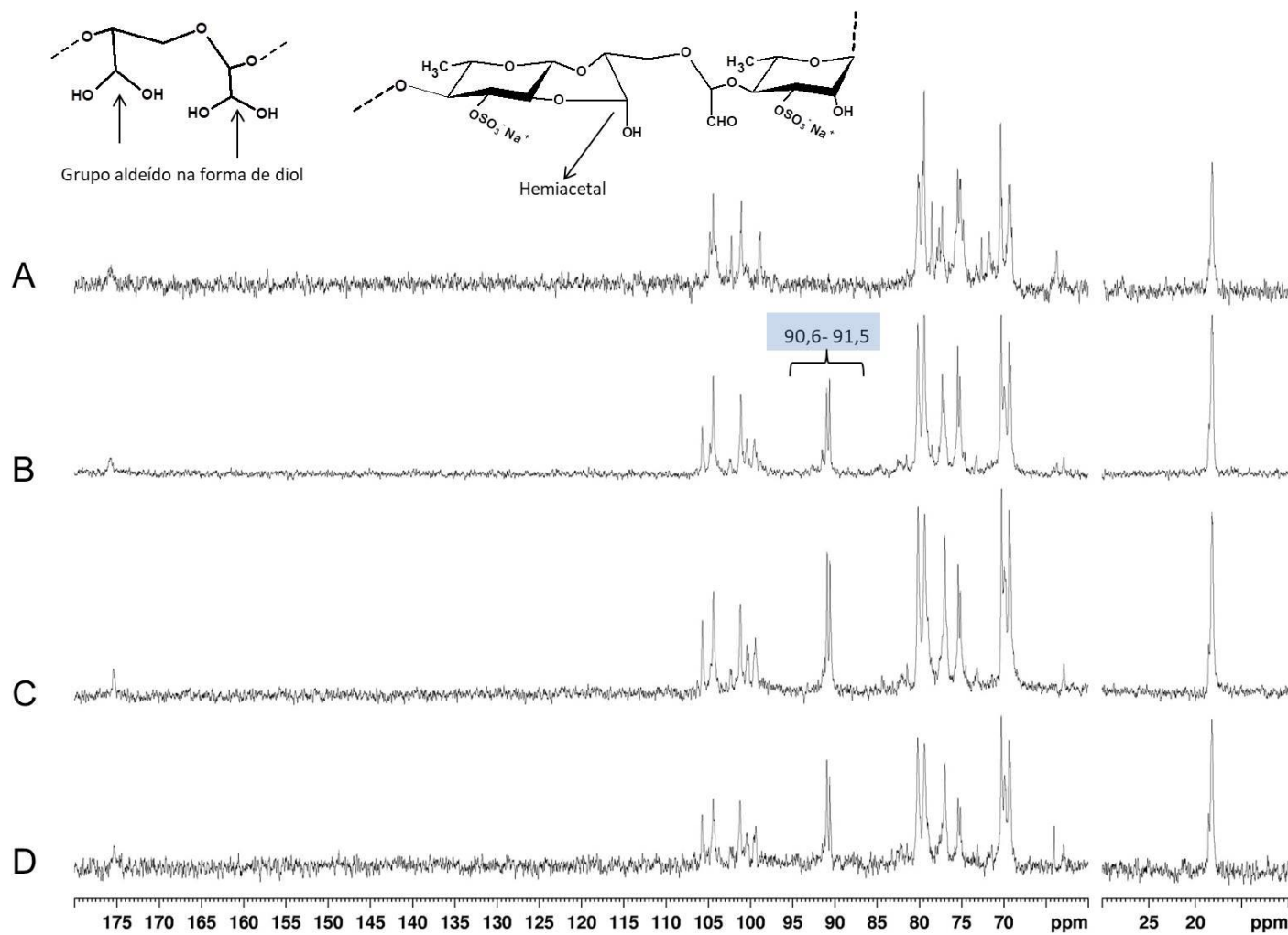
A correlação no espectro de RMN de TOCSY em 4,70/4,97 ppm permitiu assinalar o H-2 destes derivados (Figura 28). O grupo aldeído em C-2 destes derivados foi assinalado no espectro de HSQC através da correlação em 90,9/4,97 ppm. O H-3 e o H-4 dos derivados de xilose oxidada foram assinalados pelo espectro de COSY (Figura 29) em 5,15 e 3,80 ppm, respectivamente (C-3/C-4 em 90,6 e 77,1 ppm, respectivamente no espectro de HSQC).

A correlação do espectro de HSQC em 99,7/5,09 ppm foi atribuída ao C-1/H-1 das unidades de ramnose 3-sulfato da díade $U_{3\text{soxA}}$. O C-5 destas unidades foi assinalado no espectro de HMBC em 69,2 ppm. A correlação em 99,7/5,06 ppm no espectro de HSQC foi atribuída à presença de ramnose 3-sulfato entre o derivado de xilose 2,3-dialdeído e a unidade de β -D-xilose 2-sulfato.

Após a oxidação com periodato, as correlações referentes às unidades de ácido α -L-idurônico estavam ausentes, indicando que houve a formação do derivado 2,3-dialdeído-ácido idurônico. Diferentemente, as correlações referentes às unidades de ácido glucurônico foram observadas para todos os produtos oxidados com periodato, confirmando o dado observado na composição monossacarídica, o qual mostra que maior parte dos ácidos glucurônicos são resistentes à oxidação. No entanto, a oxidação com periodato pode ter originado em menor proporção, derivados de 2,3-dialdeído- ácido glucurônico.

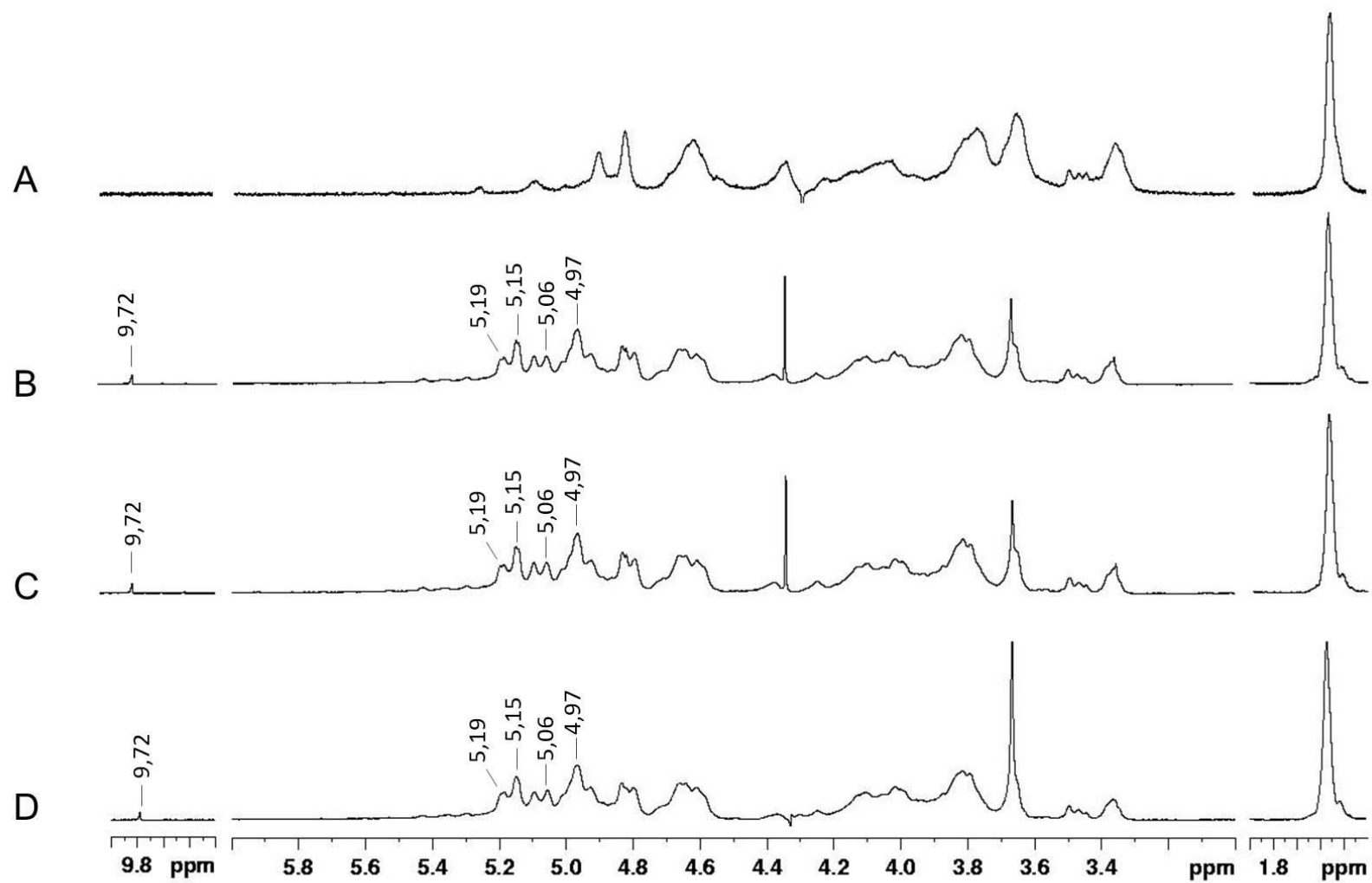
No espectro de HSQC das frações P1, P2 e P3, as correlações em 104,4/4,89 e 104,4/4,95 foram atribuídas aos derivados de ácidos glucurônico e idurônico respectivamente. As díades contendo os derivados 2,3-dialdeído-ácido glucurônico e 2,3-dialdeído-ácido idurônico foram denominadas $B_{3\text{soxA}}$ e $A_{3\text{soxA}}$, respectivamente. Esta correlação está de acordo com o C-1/H-1 dos derivados 2,3-dialdeído ácido glucurônico e idurônico obtidos após a oxidação-redução via NaIO_4 - NaBH_4 da heparina (ALEKSEEVA *et al.*, 2014).

FIGURA 23 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) e P3 (D)



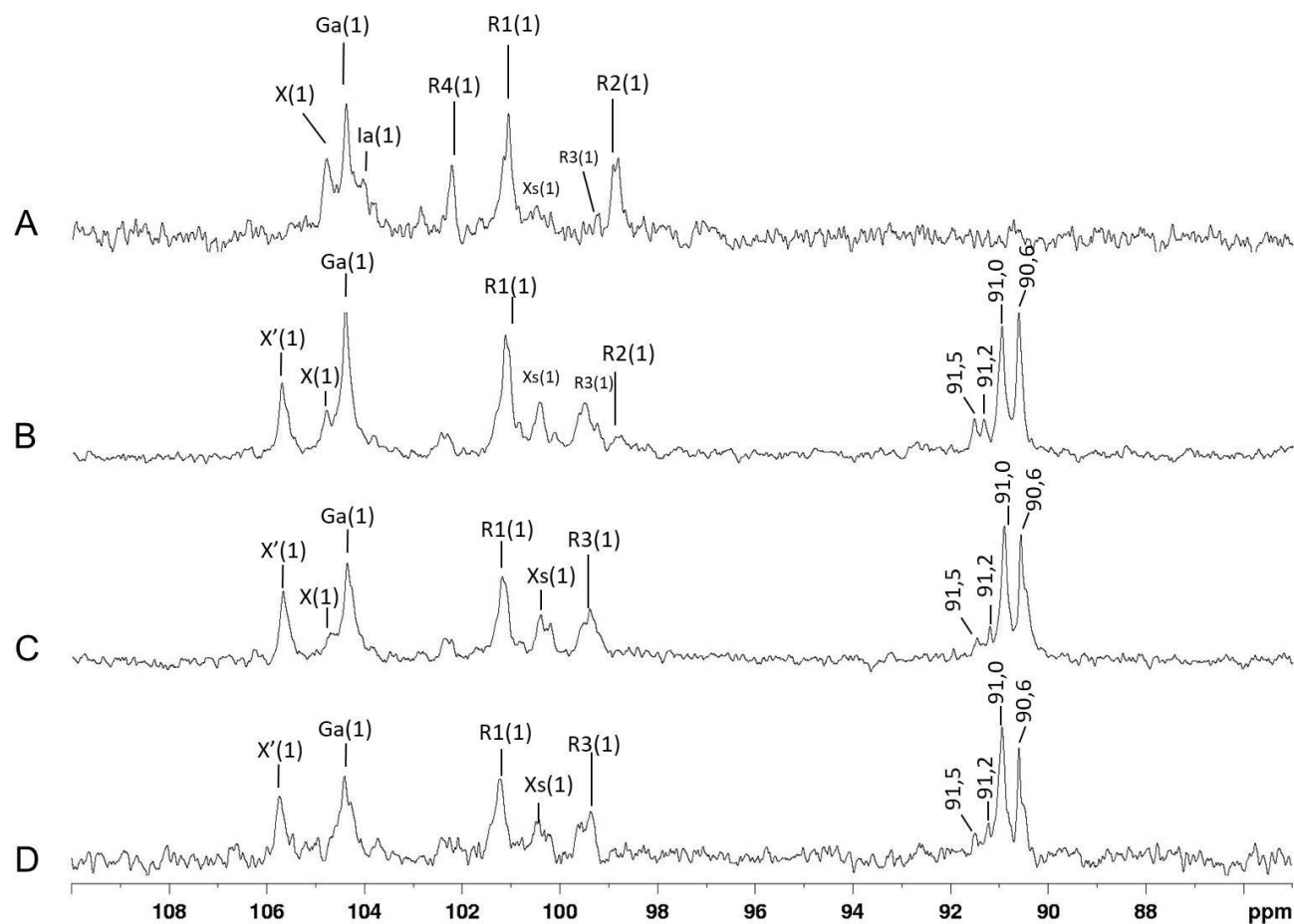
Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70°C . Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) E P3 (D)



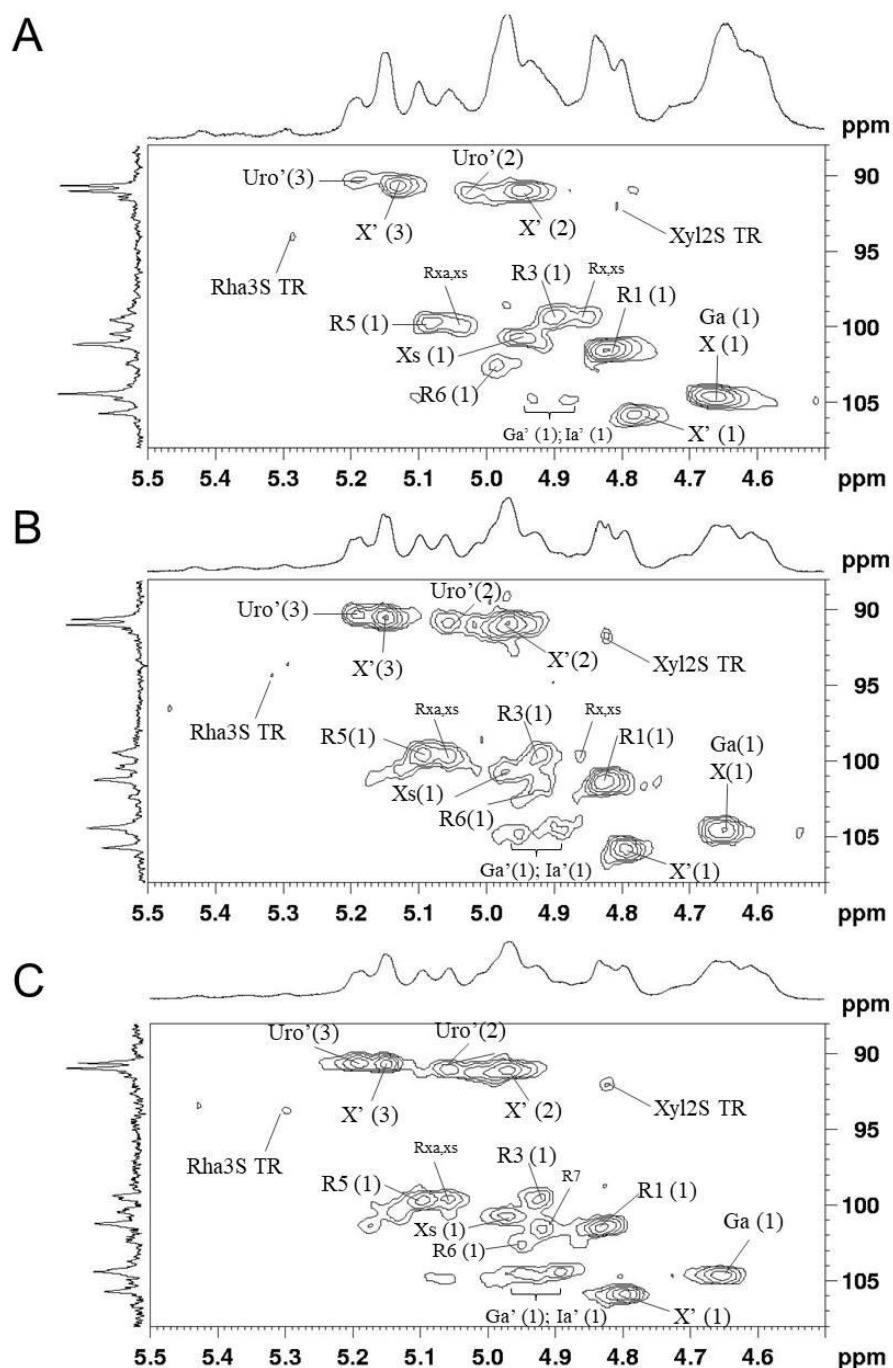
Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 2,225 ppm.

FIGURA 25 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C (REGIÃO DE 110-85 PPM) DAS FRAÇÕES F2 (A), P1 (B), P2 (C) e P3 (D)



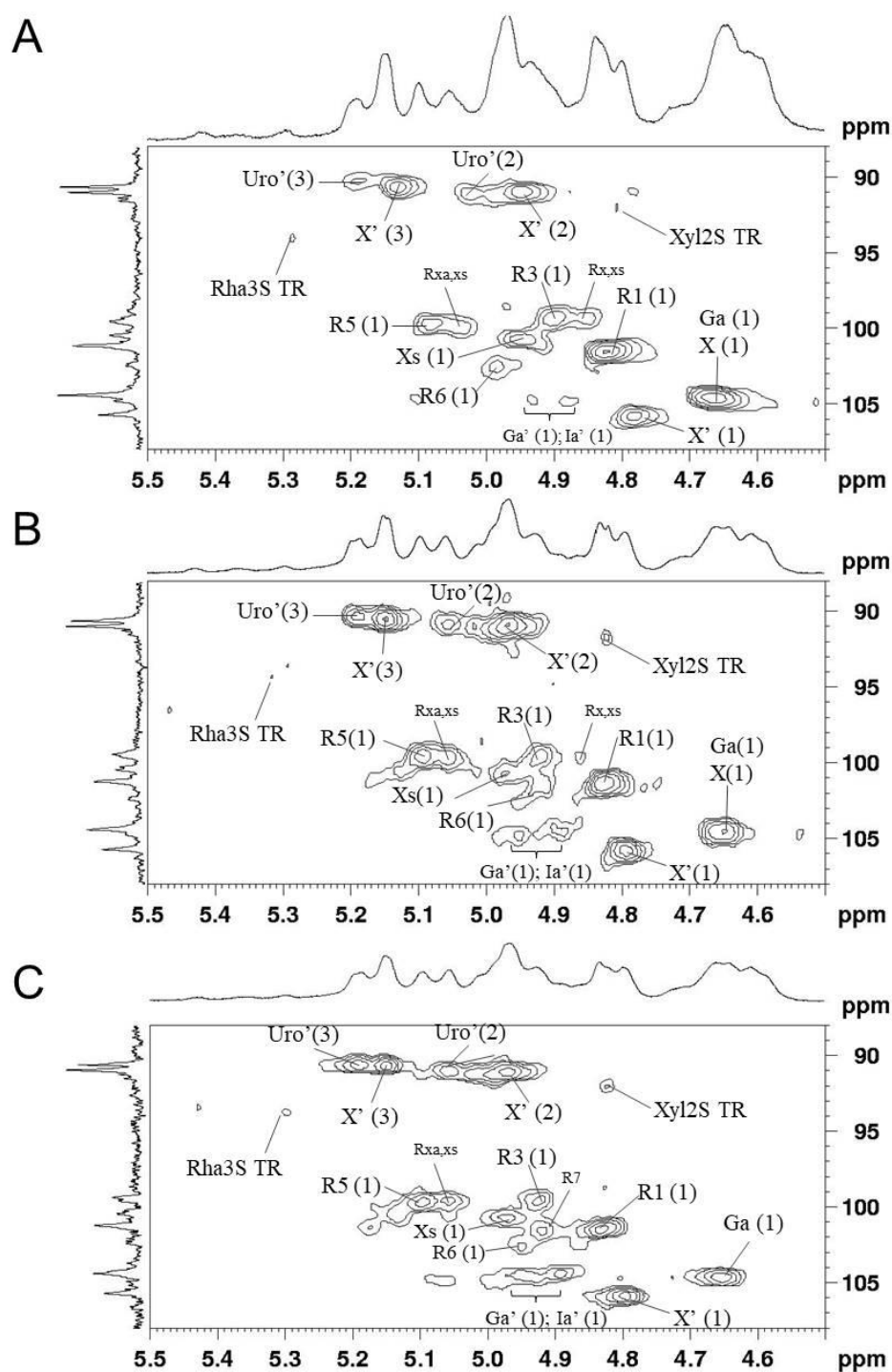
Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm. Ga e R1 = β -D-ácido glucurônico e α -L-ramnose 3-sulfato de $\text{A}_{3\text{S}}$; X e R2 = β -D-xilose e α -L-ramnose 3-sulfato de $\text{U}_{3\text{S}}$; Xs e R3 = β -D-xilose 2-sulfato e α -L-ramnose 3-sulfato de $\text{U}_{2'\text{S},3\text{S}}$; Ia e R4 = α -L-ácido idurônico e α -L-ramnose 3-sulfato de $\text{B}_{3\text{S}}$; X' e R5 = derivado 2,3-dialdeído-xilose e α -L-ramnose 3-sulfato de $\text{U}_{3\text{SOXA}}$.

FIGURA 26 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 110-88 PPM E 5,5-4,5 PPM) DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)



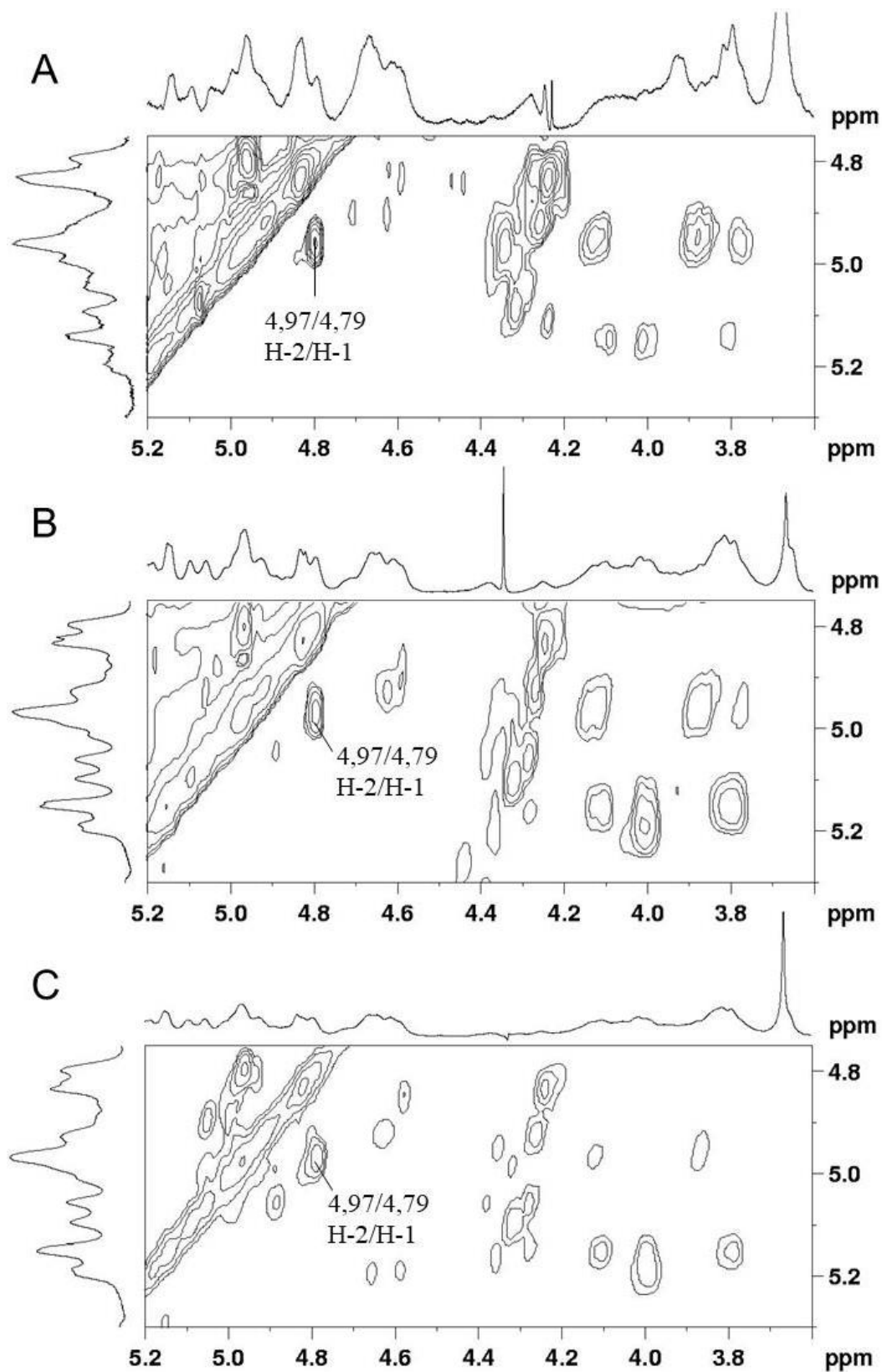
NOTA: Solvente = D₂O. Temperatura = 70 °C. Acetona como padrão interno para ¹H (2,225 ppm) e ¹³C (31,45 ppm). Ga e R1 = β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de A_{3s}; X e R2 = β-D-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{3s}; Xs e R3= β-D-xilose 2-sulfato e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{2's,3s}; Ia e R4 = α-L-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B_{3s}; X' e R5 = derivado 2,3-dialdeído-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{3sOXA}; Ia' e R6= derivado 2,3-dialdeído-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B_{3sOXA} e Ga= derivado 2,3-dialdeído-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato da diáide A_{3sOXA}. R_{x,xs} = α-L-ramnose 3-sulfato entre β-D-xilose e β-D-xilose 2-sulfato. R_{xa,xs} = α-L-ramnose 3-sulfato entre o derivado 2,3-dialdeído-xilose e β-D-xilose 2-sulfato. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 27 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 88-55 PPM E 5,0-3,0 PPM) DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)



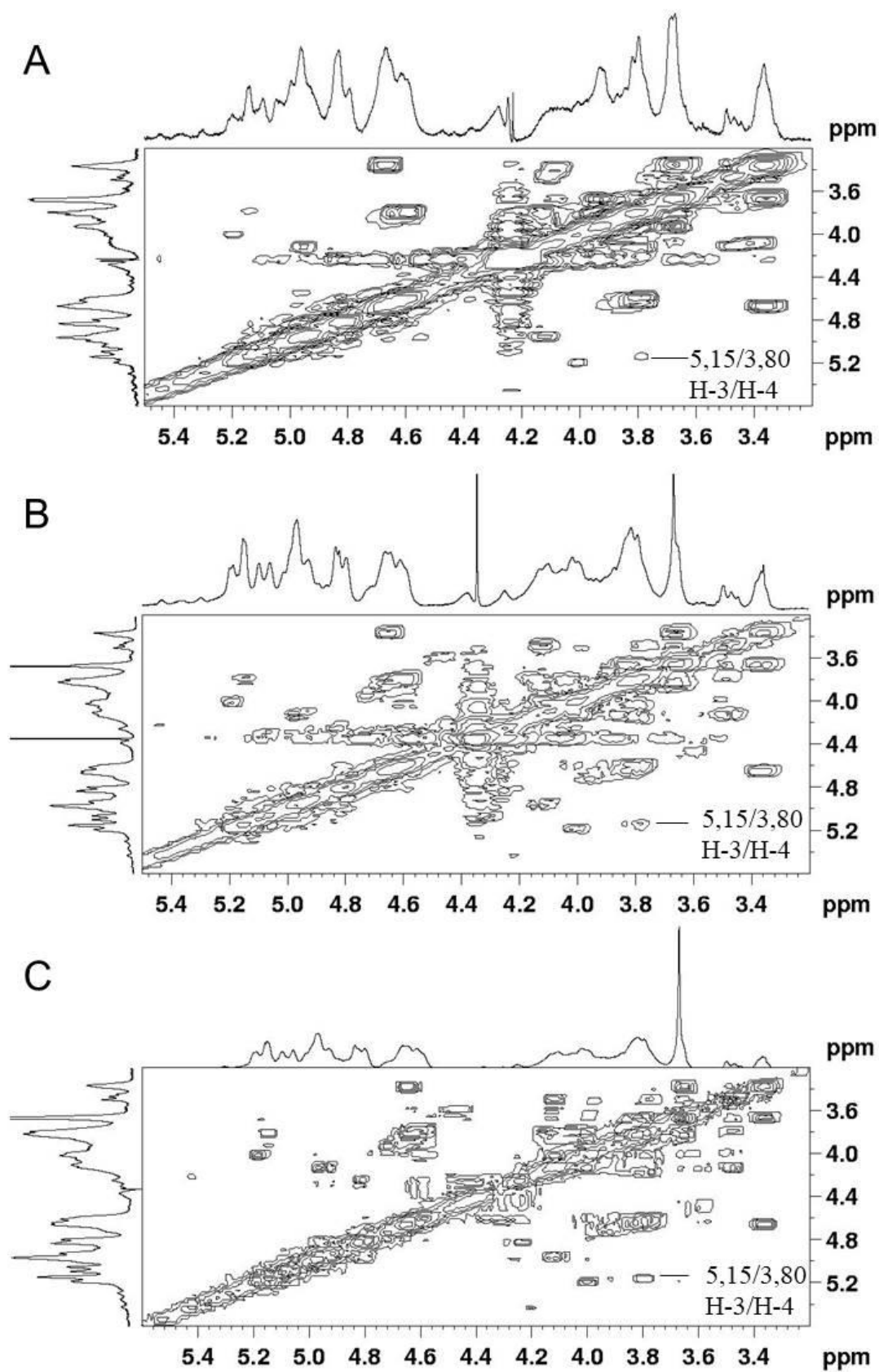
NOTA: Solvente = D₂O. Temperatura = 70 °C. Acetona como padrão interno para ¹H (2,225 ppm) e ¹³C (31,45 ppm). Ga e R1 = β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de A_{3s}; X e R2 = xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{3s}; Xs e R3= xilose 2-sulfato e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{2's,3s}; Ia e R4 = ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B_{3s}; X' e R5 = derivado 2,3-dialdeído-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{3sOXA}; Ia' e R6= derivado 2,3-dialdeído-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de B_{3sOXA} e Ga= derivado 2,3-dialdeído-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato da diáide A_{3sOXA}. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 28 - ESPECTRO DE TOCSY DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)



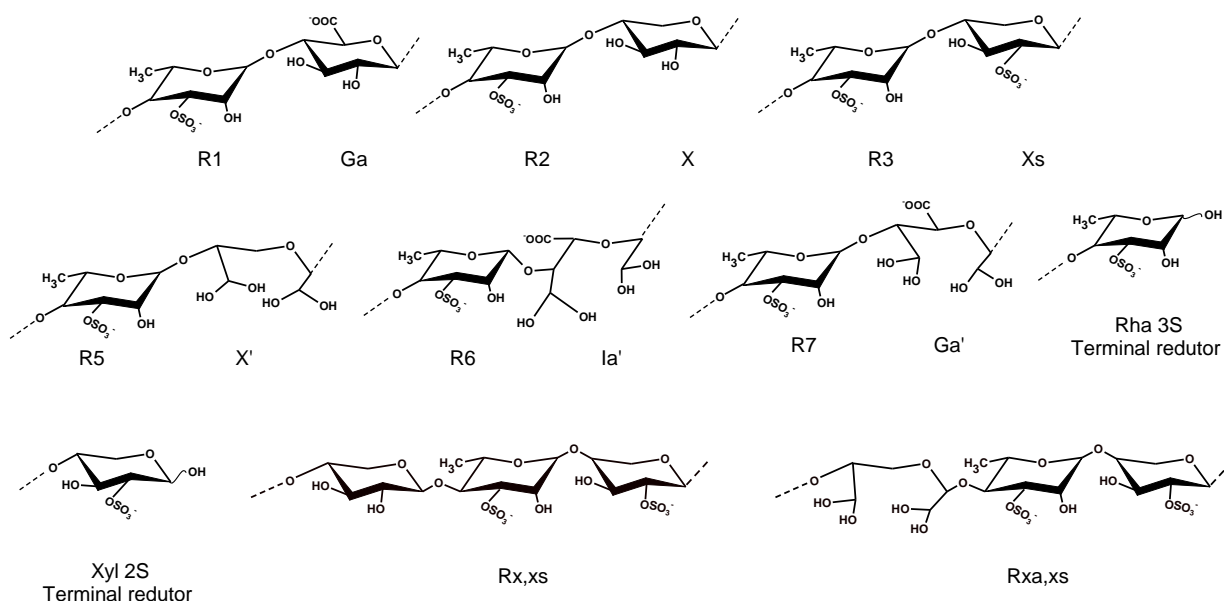
Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Espectro de RMN de ^1H calibrado com acetona em 2,225 ppm.

FIGURA 29 - ESPECTRO DE COSY DAS FRAÇÕES P1 (A), P2 (B) E P3 (C)



Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Espectro de RMN de ^1H calibrado com acetona em 2,225 ppm.

TABELA 7 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES P1, P2 E P3



Unidade	Díade	C-1/H-1	C-2/H-2	C3-H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
Ga	A _{3s} ^{a,b,c}	104,4/4,64	75,2/3,35	75,5/3,65	80,1/3,65	77,0/3,79	~175,3
R1		101,1/4,82	70,4/4,24	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
X	U _{3s} ^{a,b}	104,8/4,64	74,8/3,35	75,3/3,65	75,5/3,65	63,7	
R2		98,9/4,90	70,4/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,2/4,05	~18,2/1,33
Xs	U _{2's,3s} ^{a,b,c}	100,5/4,97	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,77	63,1	
R3		99,3/4,92	70,3/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,4/4,05	~18,2/1,33
X'	U _{3soxA} ^{a,b,c}	105,7/4,79	90,9/4,97	90,6/5,15	77,1/3,80		
R5		99,7/5,09	70,3/4,32	79,4/4,64			~18,2/1,33
Ia'	B _{3soxA} ^{a,b,c}	104,4/4,95	90,9/5,05	90,6/5,19	82,3/4,00		~175,3
R6		102,4/4,96					
Ga'	A _{3soxA} ^{a,b,c}	104,4/4,89					
R7		101,5/4,92					
Xs(TR) ^c		91,9/4,82					
Rha3S(TR) ^c		93,5/5,30					
Rx,xs ^{a,b}		98,9/4,86					
Rxa,xs ^{a,b,c}		99,7/5,06					

^aPresente em P1; ^b Presente em P2; ^c Presente em P3.

Na região anomérica do espectro de HSQC das ulvanas dialdeídicas, a correlação anomérica em 93,5/5,30 foi atribuída às unidades redutoras de α -L-ramnose 3-sulfato (LAHAYE; INIZAN; VIGOUROUX, 1998). Adicionalmente, a correlação em 91,9/4,82 ppm foi assinalada como terminal redutor de xilose 2-sulfato.

Portanto, em conjunto, as análises químicas, de composição monossacarídica e de RMN indicam que a oxidação com periodato nos diferentes tempos de reação formam ulvanas dialdeídicas contendo os derivados de xilose, ácido glucurônico e ácido idurônico 2,3-dialdeído. Nas frações P1 e P2 foram identificadas as díades A_{3s} , U_{3s} , U_{3soxA} , $U_{2's,3s}$ e B_{3soxA} . Para a fração P3, foram identificadas as díades A_{3s} , U_{3soxA} , $U_{2's,3s}$ e B_{3soxA} .

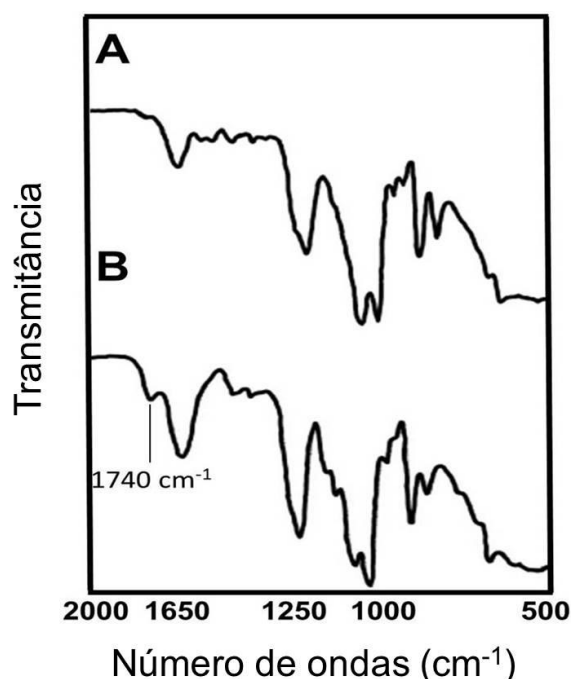
6.4 OXIDAÇÃO DA ULVANA CARBOXI-REDUZIDA (R) COM *META*-PERIODATO

A oxidação com periodato das ulvanas nativas presentes em F2 ocasionou a oxidação de unidades de β -D-xilose e de ácido idurônico, enquanto que as unidades de β -D-ácido glucurônico foram parcialmente oxidadas, mesmo com a presença de hidroxilas vicinais. Com o objetivo de verificar se esta resistência era influenciada pela presença do grupo carboxila, a ulvana carboxi-reduzida foi submetida à reação de oxidação com periodato por 72 h, originando a fração R-P3.

A ocorrência da reação de oxidação foi confirmada através da comparação dos espectros de FTIR das frações R e R-P3 (Figura 30).

A análise mostrou o aparecimento da banda em 1740 cm^{-1} , após a oxidação com periodato. A presença desta banda foi atribuída à carbonila do grupo aldeído. Desta maneira, a oxidação com periodato da fração R originou ulvanas carboxi-reduzidas dialdeídicas. A presença das bandas em 1650 e 1620 cm^{-1} nos espectros das ulvanas nativas e dialdeídicas respectivamente foram atribuídas à carbonila do grupo carboxila dos ácidos urônico e às ligações da água (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIELME, 2006).

FIGURA 30 - ESPECTRO DE FTIR DAS FRAÇÕES R (A) E R-P3 (B)



6.4.1 Rendimento, análises químicas e composição monossacarídica das ulvanas carboxi-reduzidas dialdeídicas R-P3

O rendimento e as análises químicas da fração R-P3 em relação à fração R estão representados na tabela 8. O material recuperado, em relação ao material inicial submetido à oxidação foi de 75%. A análise de carboidratos totais mostrou uma diminuição no teor de carboidratos de R-P3 (63,4%) em relação à R (45,3%). Este dado sugere que houve 28,5% de oxidação das unidades monossacarídicas. Os teores de sulfato e ácidos urônicos da fração R-P3 (19 e 2,3%, respectivamente) foram similares a da fração R (21 e 2%, respectivamente), indicando que a oxidação com periodato não alterou estas unidades. Para ambas as frações os teores de proteína foram abaixo de 3,8%.

A fração R foi submetida ao processo de hidrólise ácida total e analisada por GC-MS na forma de acetatos de alditol. O resultado desta análise está representado na tabela 9. A composição monossacarídica de R-P3 mostrou que houve um

aumento no teor de ramnose em relação à R. Já a percentagem das unidades de xilose e idose de R-P3 diminuíram em relação à sua fração original.

TABELA 8 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA ULVANA CARBOXI-REDUZIDA R E CARBOXI-REDUZIDA DIALDEÍDICA R-P3

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos (%) ^a	Ácidos urônicos (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Proteína (%) ^d
R	70,0 ^e	63,4	2,0	21,0	2,8
R-P3	75,0 ^f	45,3	2,3	19,0	3,8

n.d. = não determinado. ^a Dubois *et al.*, 1956. ^b Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^c Dodgson; Price, 1962.

^d Lowry *et al.*, 1951. ^e Material recuperado após carboxi-redução. ^f Material recuperado após a oxidação com periodato.

O derivado 1,6,6-trideutério -glucitol-hexaacetato apresentou uma diminuição de 19,3 mol% (Fração R) para 6 mol% para a fração R-P3. Este derivado corresponde na fração F2 às unidades de β -D-ácido glucurônico, a qual havia se mostrado resistente à oxidação com periodato. Portanto, a resistência à oxidação com periodato apresentada pelas unidades de β -D-ácido glucurônico da fração F2 deve decorrer da presença dos grupos carboxila destas unidades.

TABELA 9 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA ULVANA CARBOXI-REDUZIDA R E CARBOXI-REDUZIDA DIALDEÍDICA R-P3

Fração	Monossacarídeos (mol%)						
	Rha	Xyl	Gal	3-Me-O-Gal ^a	Glc ^b	Glc ^c	Ido ^d
R	50,4	18,0	1,7	1,8	3,7	19,3	5,1
R-P3	66,8	12,1	3,5	5,4	7,2	5,0	-

= não identificado. ^a Identificado pela presença do íon 130 m/z. ^b Identificado na forma de glucitol-hexaacetato (íon 217 m/z). ^c Identificado na forma de 1,6,6-trideutério-glucitol-hexaacetato (íon 219 m/z). ^d Identificado na forma de 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-iditol.

A análise de composição monossacarídica de R-P3 também mostrou que houve um aumento no teor do derivado glucitol hexaacetato de 3,7 para 8,6% para R e R-P3 respectivamente. Este resultado indica que as unidades de glucose também não são oxidadas com periodato.

6.4.2 Análise por RMN mono- e bidimensionais das ulvanas carboxi-reduzidas dialdeídicas R-P3

As análises de RMN da fração F2 mostraram a presença das díades A_{3s} , B_{3s} , U_{3s} e $U_{2's,3s}$. Após a carboxi-redução de F2, originando a fração R, foi observada a conversão dos β -D-ácidos glucurônico e α -L-idurônico em seus monossacarídeos neutros correspondentes. As díades contendo glucose e idose foram denominadas A_{3sCR} e B_{3sCR} , respectivamente. A fração R foi oxidada com periodato originando a fração R-P3 e as díades presentes após a oxidação foram identificadas através da análise de RMN por ^{13}C .

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou que houve o aparecimento dos sinais na região de 88,8-90,9 ppm após a oxidação com periodato, os quais foram atribuídos aos carbonos do grupo aldeído na forma de diol e/ou hemiacetal (Figura 31).

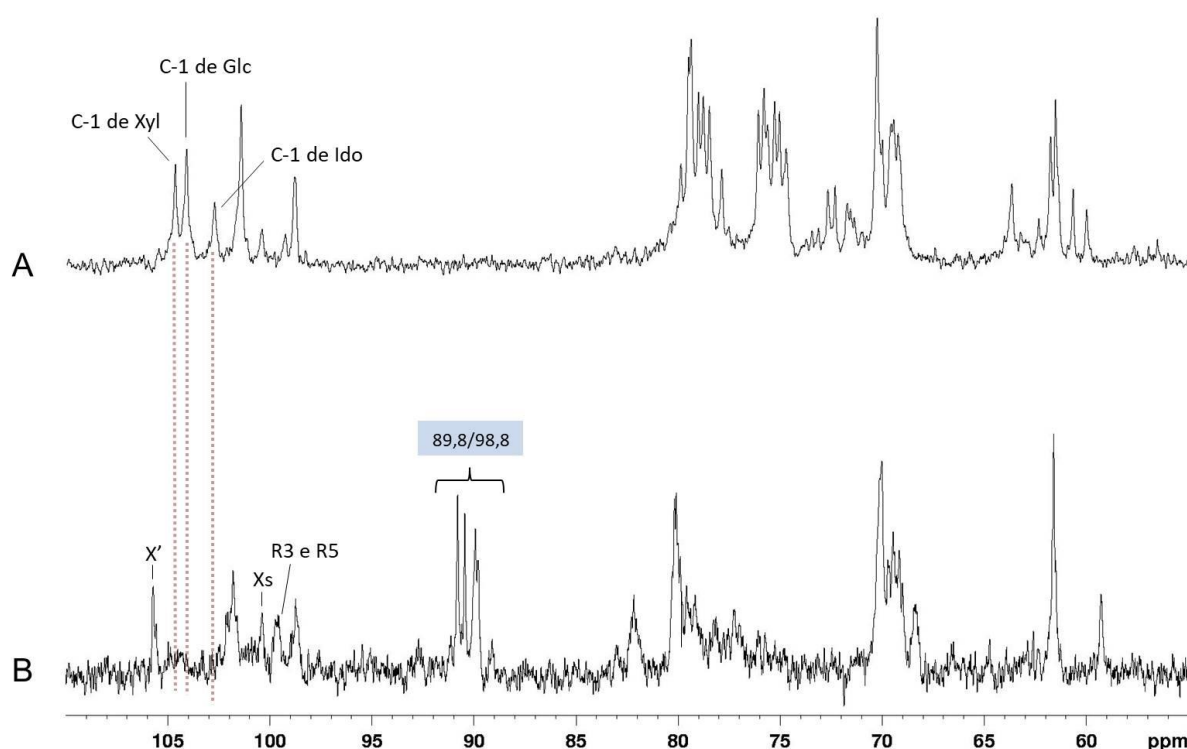
Na região anomérica deste espectro foi possível observar o C-1 das unidades de β -D-xilose 2-sulfato e ramnose 3-sulfato da díade $U_{2's,3s}$ em 100,5 e 99,3 ppm, respectivamente, bem como os C-1 dos derivados 2,3-dialdeído-xilose e das unidades de ramnose 3-sulfato da díade U_{3sOxA} em 105,7 e 99,7, respectivamente. Foi possível observar que houve o desaparecimento do sinal em 102,6 ppm, atribuído ao C-1 das unidades de idose, indicando que estas unidades são susceptíveis à oxidação com periodato.

Também foi possível observar que o desaparecimento das correlações referentes às unidades de glucose da díade A_{3sCR} . Portanto, este dado confirma o dado da composição monossacarídica, o qual mostra que houve oxidação da glucose a qual na fração original (F2) correspondia às unidades de β -D-ácido glucurônico.

Sendo assim, pode-se inferir que a resistência à oxidação com periodato apresentada pelas unidades de β -D-ácido glucurônico está relacionada com a presença do grupo carboxila.

As análises de RMN sugerem que as ulvanas carboxi-reduzidas dialdeídicas presentes em R-P3 são formadas pelas díades: $U_{2's,3s}$, U_{3sOxA} e U_{roxA} .

FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES R (A) E R-P3 (B)



Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm. Xs e R3= β -D-xilose 2-sulfato e α -L-ramnose 3-sulfato de $U_{2's,3s}$, X' e R5 = derivado 2,3-dialdeído-xilose e α -L-ramnose 3-sulfato de U_{3sOxA} .

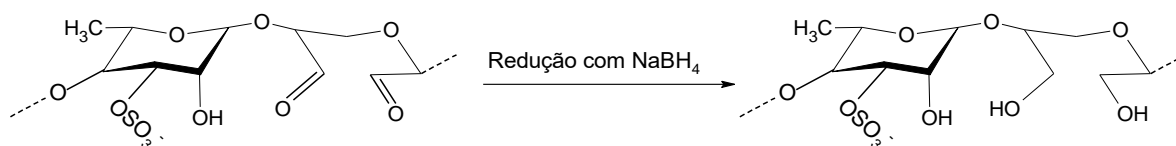
6.5 TRATAMENTO DA FRAÇÃO P3 COM $NaBH_4$

Visando a redução dos grupos aldeído das ulvanas dialdeídicas, a fração P3 foi tratada com $NaBH_4$, originando a fração P3-r (Figura 32).

A ocorrência da reação de redução foi confirmada através da comparação dos espectros de FTIR das frações P3 e P3-r (Figura 33). A análise mostrou o decréscimo da banda em 1740 cm^{-1} , após a redução. Esse dado sugere que houve

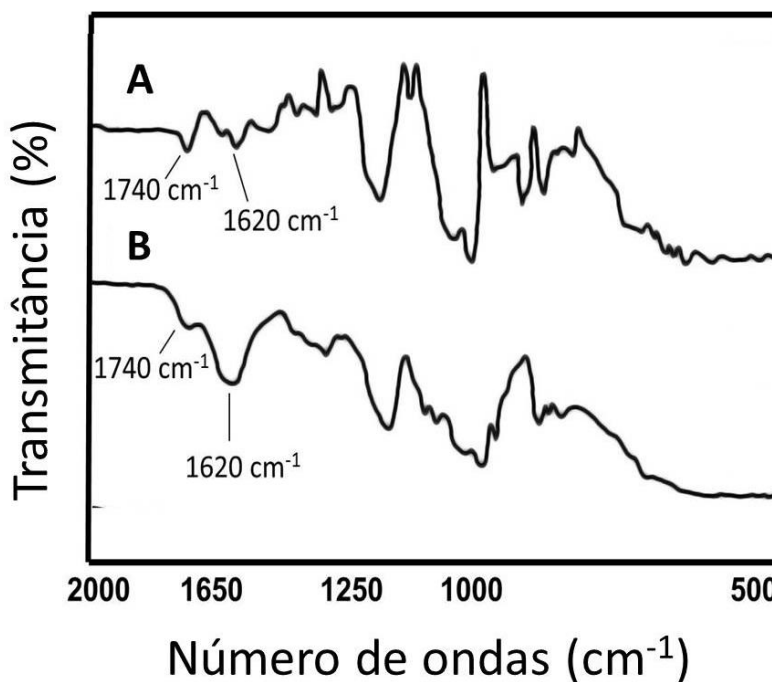
redução dos grupos aldeído para álcoois primários. A presença da banda em 1740 cm^{-1} na fração P3-r é de baixa intensidade e resultado da incompleta redução dos grupos aldeído.

FIGURA 32 - TRATAMENTO COM NaBH_4 DOS GRUPOS ALDEÍDO DOS DERIVADOS DE ULVANAS OBTIDOS APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO_4



A presença da banda em 1620 cm^{-1} nos espectros de ambas as frações foi atribuída à carbonila do grupo carboxila dos ácidos urônico e às ligações da água (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIELME, 2006).

FIGURA 33 - ESPECTRO DE FTIR DAS FRAÇÕES P3 (A) E P3-r (B)



6.5.1 Análises químicas e composição monossacarídica das ulvanas dialdeídicas reduzidas P3-r

O rendimento e as análises químicas de P3-r em relação a P3 estão representados na tabela 10.

O material recuperado, em relação ao material inicial submetido à oxidação foi de 73,0%. A análise de carboidratos totais mostrou uma diminuição no teor de carboidratos de 51,1 (-P3) para 46% (P3-r). Os teores de urônico (11,8%) e sulfato (19,3%) de P3-r foram similares ao de sua fração de origem (12,5 e 21,2% de ácidos urônicos e sulfato respectivamente).

A análise de composição monossacarídica de P3-r também se mostrou similar à de P3, sugerindo que o tratamento com NaBH_4 não provocou extensa despolimerização na cadeia polissacarídica (Tabela 11).

TABELA 10 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES P3 E P3-r

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos totais (%) ^a	Ácidos urônicos (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Proteína (%) ^d
P3	91,0 ^e	51,1	12,5	21,2	3,0
P3-R	73,0 ^f	46,0	11,8	19,3	1,5

^a Dubois *et al.*, 1956. ^b Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^c Dodgson; Price, 1962. ^d Lowry *et al.*, 1951.

^e Material recuperado após a oxidação com periodato. ^f Material recuperado após o tratamento com NaBH_4 .

TABELA 11 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES P3 E P3-r

Fração	Monossacarídeos (mol%)				
	Rha	Xyl	Gal	3-Me-O-Gal ^a	Glc
P3	81,9	8,8	Tr.	3,3	5,5
P3-r	78,6	8,5	1,9	4,3	6,7

^a Identificado pela presença do íon 130 m/z

6.5.2 Análise de RMN das ulvanas dialdeídicas reduzidas P3-r

A análise de RMN de ^{13}C mostrou que após o tratamento de P3 com NaBH_4 , o qual originou a fração P3-r, houve o desaparecimento dos sinais na região de 90,6-91,5 ppm, concomitante ao aparecimento dos sinais na região de 61,8-66,0 ppm (Figura 34). Estes novos sinais foram atribuídos aos carbonos dos álcoois primários em C-2 e C-3 dos derivados de xilose e ácido idurônico. Ainda, no espectro de HSQC da fração P3 foi observado o desaparecimento das correlações atribuídas ao C-1/H-1 das unidades de ramnose 3-sulfato e β -D-xilose-2-sulfato como terminal redutor (Figura 35). Portanto, o tratamento com NaBH_4 foi eficaz na redução dos grupos aldeído à álcoois primários, tanto das unidades que foram susceptíveis à oxidação com periodato, quanto das unidades redutoras.

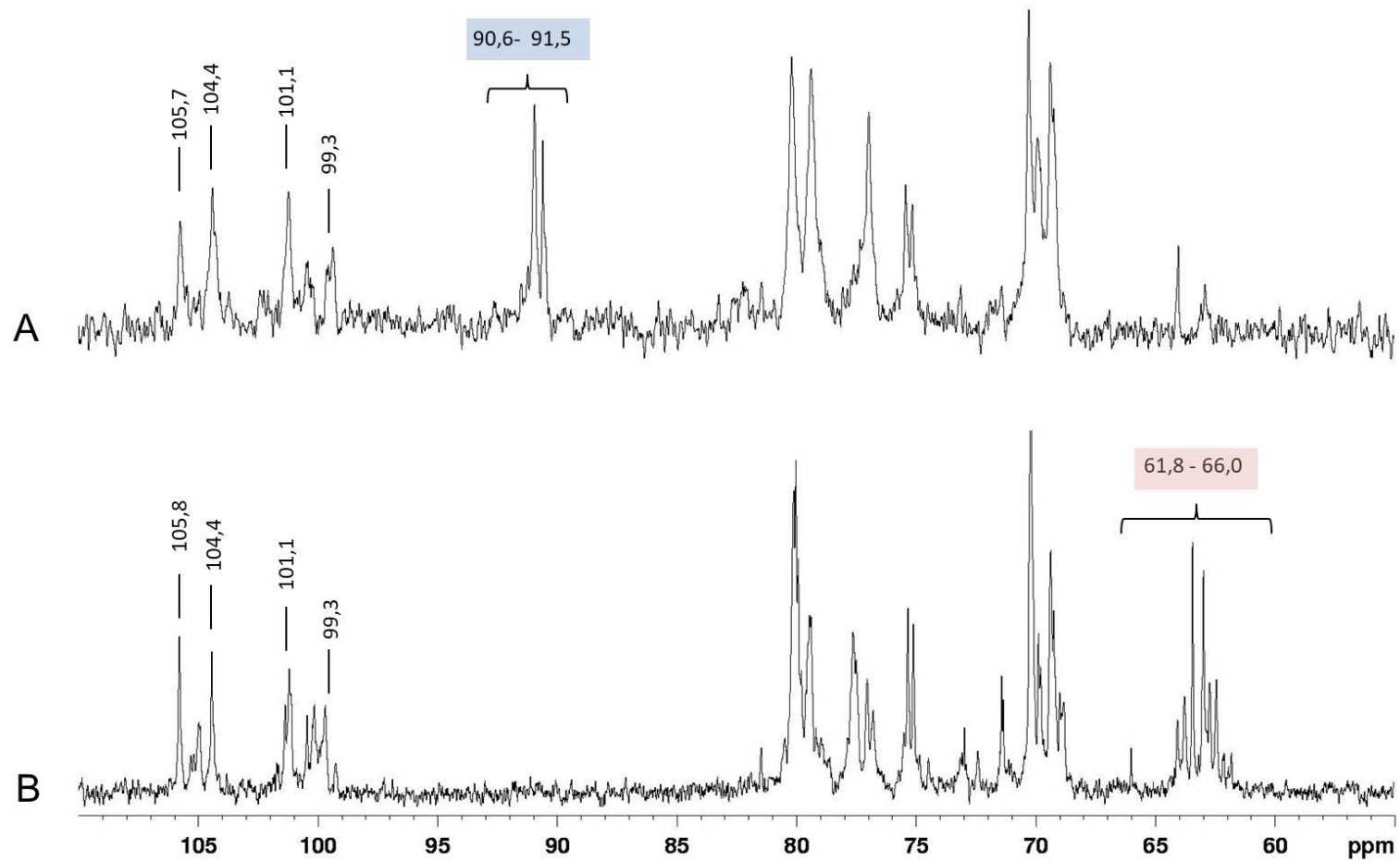
As análises de RMN de ^{13}C , ^1H , HSQC, COSY e TOCSY permitiram identificar as díades presentes na fração P3-r (Figuras 34, 35 e 36). As correlações destas díades estão representadas na tabela 12.

No espectro de HSQC foi possível identificar as correlações referentes ao C-1/H-1 das unidades de β -D-ácido glucurônico e β -D-xilose-2-sulfato, bem como das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato adjacentes a essas unidades. Portanto, as ulvanas dialdeídicas reduzidas presentes em P3-r são formadas pelas díades A_{3s} e $U_{2's,3s}$.

A correlação no espectro de HSQC em 105,8/4,91 ppm foi atribuída ao C-1/H-1 dos derivados de xilose oxidada e reduzida. As novas díades formadas contendo estes derivados foram denominadas U_{3sgs} . No espectro de COSY (Figura 36A), a correlação em 4,91/3,58 permitiu identificar o H-2 destes derivados (C-2 em 63,8 ppm). O espectro de TOCSY (Figura 36B) permitiu identificar o H-3 e o H-4 em 3,75 e 3,94 ppm respectivamente (C-3 e C-4 em 63,0 e 77,8 ppm respectivamente).

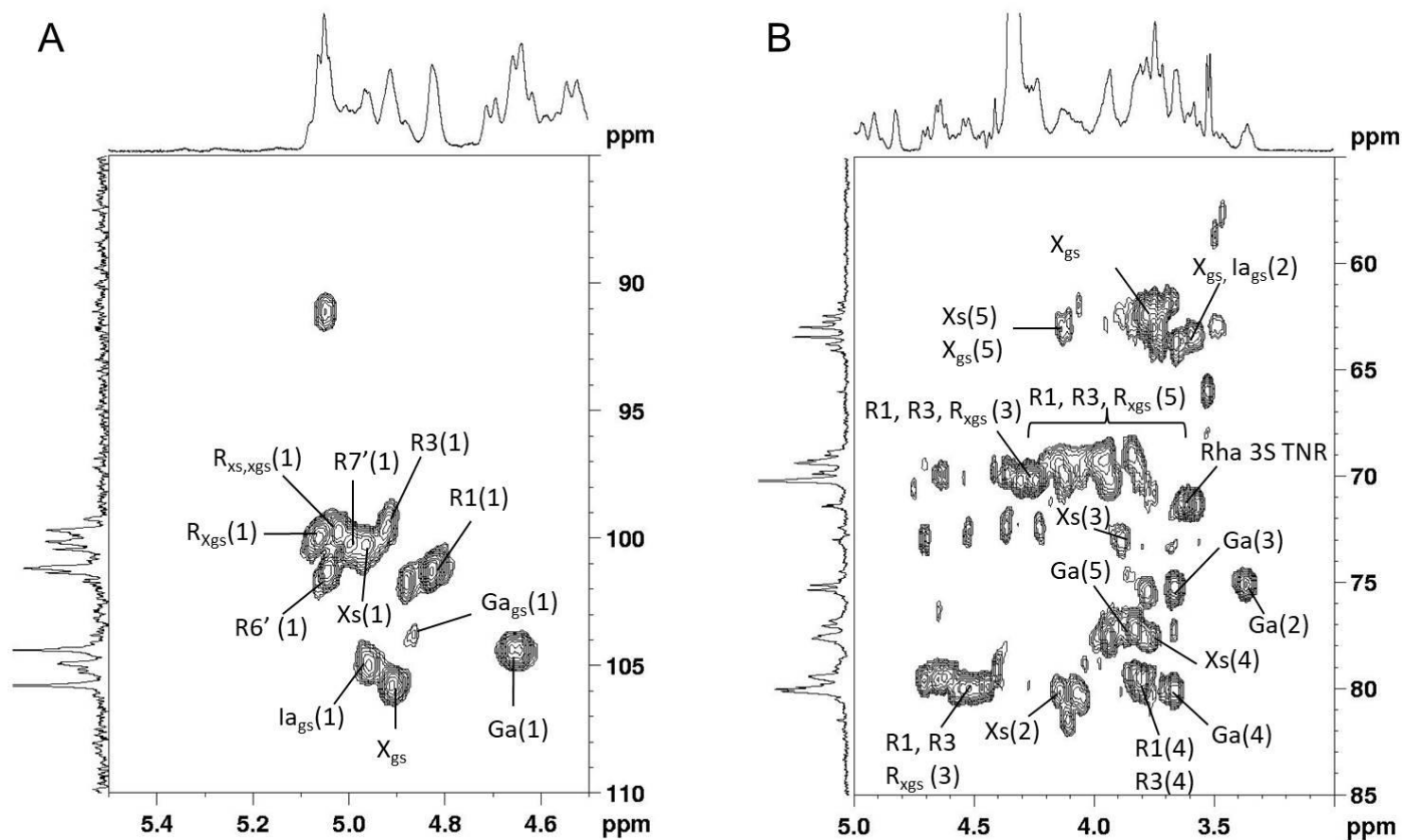
No espectro de HSQC, a correlação em 100,1/5,06 ppm foi atribuída às unidades de ramnose da díade U_{3sgs} . Já a correlação em 99,8/5,02 ppm foi atribuída à unidade de α -L-ramnose-3-sulfato entre xilose oxidada-reduzida e β -D-xilose 2-sulfato.

FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES P3 (A) E P3-r (B)



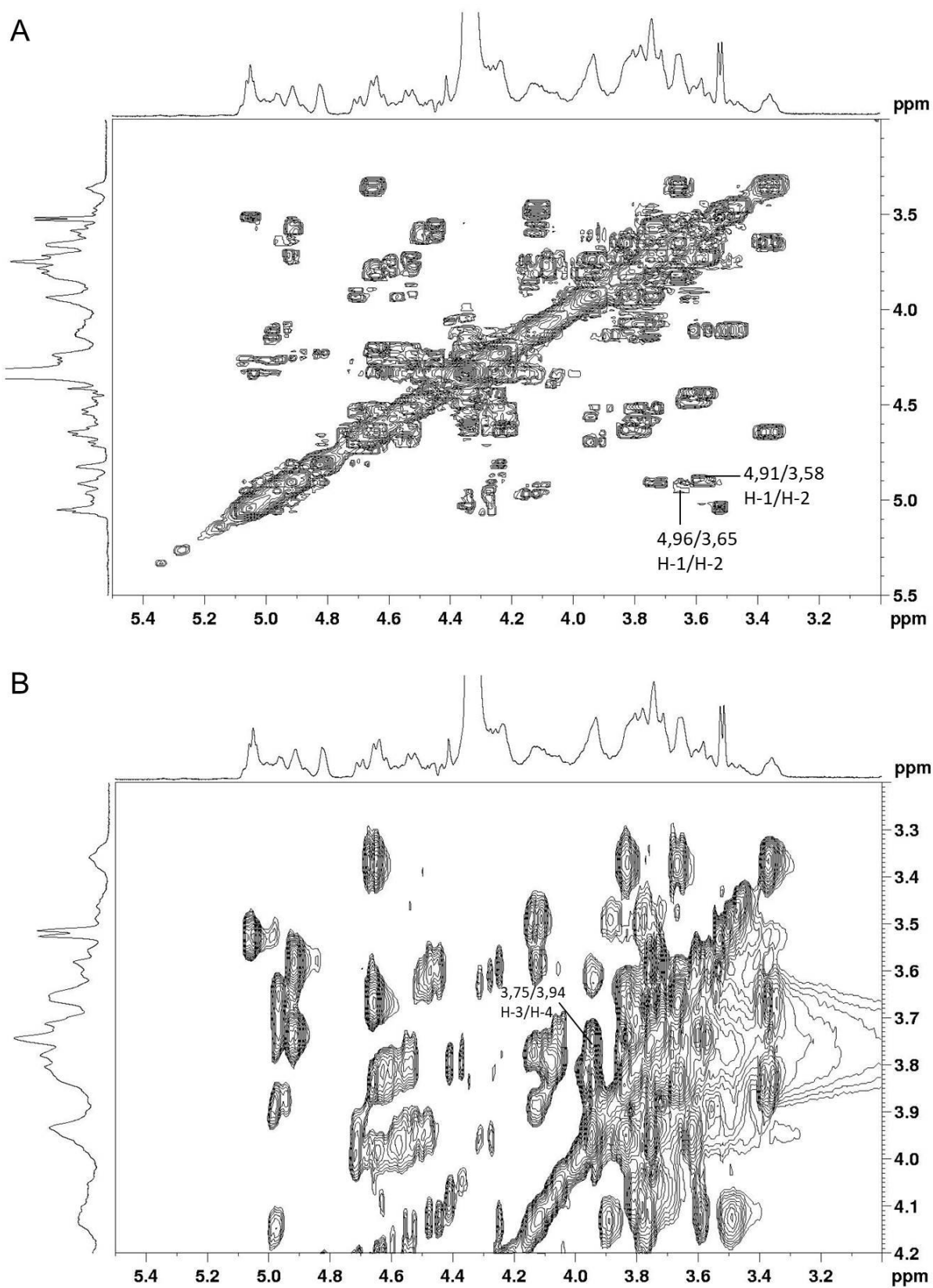
Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 35 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO P3-r



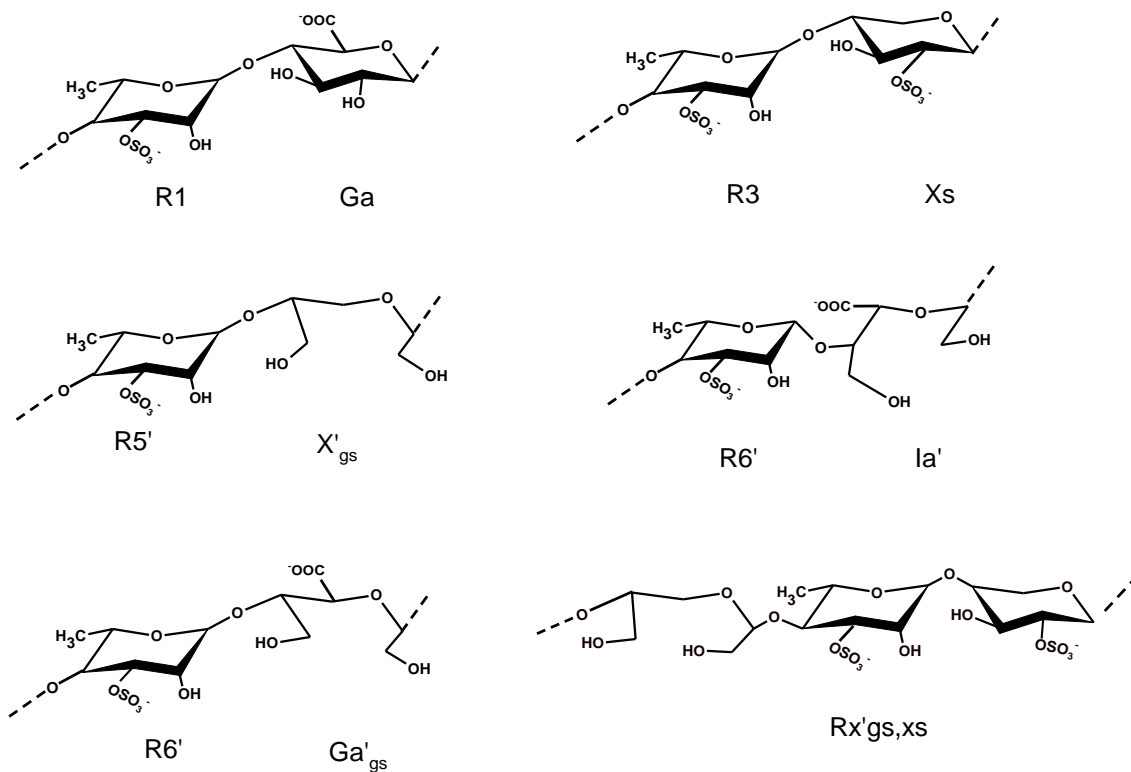
Nota: Solvente = D₂O. Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm para ¹³C e 2,225 para ¹H. Ga e R1 = β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato de A_{3s}; Xs e R3= β-D-xilose 2-sulfato e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{2's,3s}; X_{gs} e R_{Xgs} = xylose oxidada-reduzida e α-L-ramnose 3-sulfato de U_{3s,gs}; I_{ags} e R6' = derivado de ácido idurônico oxidado-reduzido e α-L-ramnose 3-sulfato. Ga e R7' = derivado de ácido glucurônico oxidado-reduzido e α-L-ramnose 3-sulfato. Rx,xgs = α-L-ramnose 3-sulfato entre o derivado de xilose oxidado-reduzido e β-D-xilose 2-sulfato. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN DE COSY (A) e TOCSY (B) DA FRAÇÃO P3-r



Solvente = D₂O. Temperatura = 70 °C. Espectro de RMN de ¹H calibrado com acetona em 2,225 ppm.

TABELA 12 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DA FRAÇÃO P3-r



Unidade	Díade	C-1/H-1	C-2/H-2	C3-H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
Ga	A _{3s}	104,4/4,64	75,2/3,35	75,5/3,65	80,1/3,65	77,0/3,79	~175,3
R1		101,1/4,82	70,4/4,24	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
Xs	U _{2's,3s}	100,5/4,97	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,77	63,1	
R3		99,3/4,92	70,3/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,4/4,05	~18,2/1,33
X _{gs}	U _{3sgs}	105,8/4,91	63,8/3,58	63,0/3,75	77,8/3,94	63,0/4,10	
R5'		101,1/5,06	70,4/4,32	79,4/4,63			
Ia _{gs}	B _{3sgs}	105,0/4,96	63,8/3,65				
R6'		101,2/5,05					~18,2/1,33
Ga _{gs}	A _{3sgs}	103,8/4,86					
R7'		100,1/5,00					
R _{g'gsxs}		99,8/5,02					

A correlação em 105,0/4,96 ppm foi atribuída à presença dos derivados de ácido idurônico oxidado e reduzido. No espectro de COSY, o H-1 em 4,96 ppm correlaciona com o H-2 em 3,65 ppm (C-2 em 63,8 ppm). O C-3 destas unidades foi assinalado em 63,0/3,72. Os demais sinais desta unidade não foram identificados devido a sobreposição dos sinais. A díade contendo os derivados oxidados e reduzidos dos idurônicos foi denominada B_{3sgs}. Para o espectro da heparina oxidada-reduzida, a correlação referente aos C-1/H-1 do derivados de ácido idurônico foi assinalada em 106,9/4,94-4,98 ppm (ALEKSEEVA *et al.*, 2014).

A correlação em 103,8/4,86 ppm foi atribuída à presença dos derivados de ácido glucurônico oxidado e reduzido. Para o espectro da heparina oxidada-reduzida, a correlação referente aos C-1/H-1 do derivado de ácido glucurônico foi assinalada em 106,4-106,7/4,71-4,87 ppm (ALEKSEEVA *et al.*, 2014).

A correlação do C-1/H-1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato adjacentes aos oxidados-reduzidos dos ácidos idurônico foram assinaladas em 101,2/5,05 e 101,1/5,00 ppm, respectivamente.

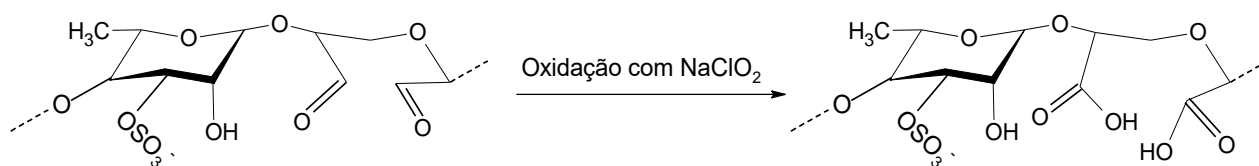
No espectro de HSQC, a correlação em 91,1/5,05 ppm indica que parte dos grupos aldeído não foram reduzidos com NaBH₄, indicando a presença de grupos aldeído mais resistentes à redução. Estes grupos, provavelmente encontram-se na forma de hemiacetal cíclico, os quais podem ser formados entre o grupo aldeído de uma unidade oxidada e a hidroxila da unidade não oxidada vizinha. Esses hemiacetais cíclicos são mais estáveis quando comparado com os aldeídos livres.

As análises de RMN sugerem que as ulvanas dialdeídicas reduzidas presentes na fração P3-r são formadas pelas díades: A_{3s}, U_{2's,3s}, U_{3sgs}, B_{3sgs} e A_{3sgs}.

6.6 OXIDAÇÃO COM CLORITO EM ESCALA ANALÍTICA

A reação com clorito foi realizada com o objetivo de converter os grupos aldeídos em ácidos carboxílicos, conforme descrito por Dalcanele e Montanari (1986) (Figura 37).

FIGURA 37 - OXIDAÇÃO COM NaClO_2 DOS GRUPOS ALDEÍDO DOS DERIVADOS ULVANAS OBTIDOS APÓS OXIDAÇÃO COM NaIO_4



Estas reações foram realizadas inicialmente em escala analítica com a fração P3 como modelo utilizando diferentes concentrações de NaClO_2 e diferentes valores de temperatura. Esta fração foi escolhida por apresentar no espectro de FTIR a banda em 1740 cm^{-1} , referente aos carbonos da carboxila do grupo aldeído, em maior intensidade quando comparado com P1 e P2.

Os produtos obtidos após a oxidação da fração P3 com NaClO_2 foram comparados quanto ao rendimento da reação e do teor de grupos carboxila. Primeiramente, foi realizada a reação com clorito da fração P3 utilizando duas diferentes concentrações de NaClO_2 .

As análises químicas e espectroscópicas da fração P3 mostraram que esta fração é formada pelas díades: $[\rightarrow 4)\text{-}2,3\text{-dialdeído-ácido urônico-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-ramnose 3-sulfato-(1}\rightarrow]$ e $[\rightarrow 4)\text{-}2,3\text{-dialdeído-xilose-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-ramnose 3-sulfato-(1}\rightarrow]$, as quais possuem quatro grupos aldeído passíveis de oxidação. Portanto, para 1 equivalente grama de polissacarídeo, são necessários no mínimo 4 equivalentes de NaClO_2 .

P3 foi oxidada com NaClO_2 com 6 e 8 equivalentes de NaClO_2 . O rendimento das reações e os teores de grupamentos carboxila estão representados na tabela 13.

A fração obtida após a oxidação de P3 com 6 equivalentes de NaClO_2 apresentou maior rendimento e maior teor de grupos carboxila em relação à fração obtida após a oxidação com 8 equivalentes. Este dado sugere que o excesso de NaClO_2 pode ter provocado uma despolimerização parcial das ulvanas dialdeídicas, acarretando na perda de unidades oxidadas.

A fração P3 também foi oxidada com 6 equivalentes de NaClO_2 a $30\text{ }^\circ\text{C}$. Esta reação apresentou um conteúdo de COOH ligeiramente maior quando comparado

com a reação a 10 °C e 6 equivalentes de NaClO₂. No entanto, o rendimento da reação a 30 °C foi menor quando comparado com a reação a 10 °C. Desta maneira, considerando o rendimento e o teor de grupos carboxila, foi selecionada a condição de 6 equivalentes de NaClO₂ e temperatura de 10 °C.

TABELA 13 - RENDIMENTO E TEOR DE GRUPOS CARBOXILA DAS REAÇÕES DE P3 COM CLORITO DE SÓDIO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AGENTE OXIDANTE E TEMPERATURA

Fração	Equivalentes de NaClO ₂	Temperatura (°C)	Rendimento (%) ^a	COOH (mmol.g ⁻¹)
P3	-	-	-	0,38
	6	10	90,0	1,79
	8	10	70,0	1,73
	6	30	53,0	1,89

^a Material recuperado após a oxidação com clorito

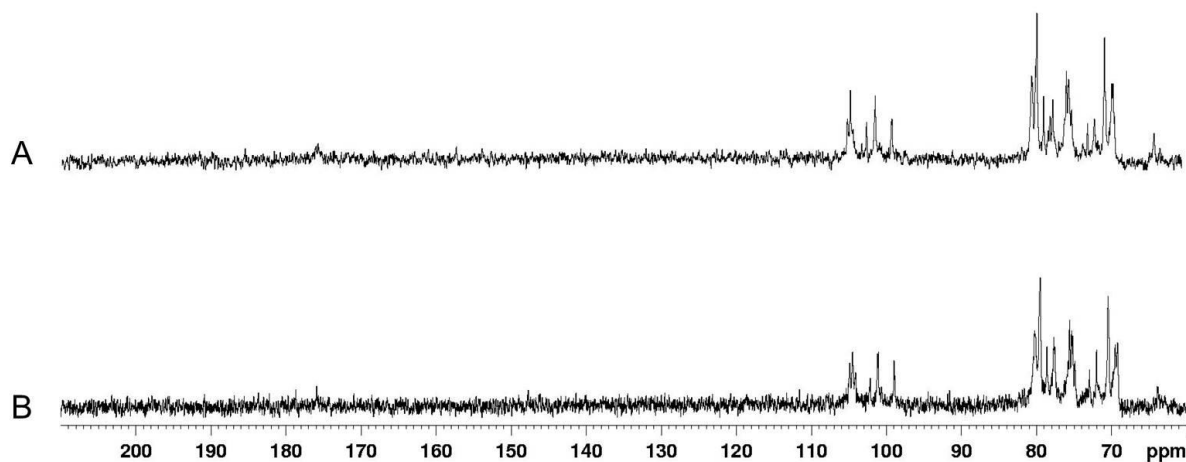
6.7 OXIDAÇÃO DAS ULVANAS NATIVAS F2 COM CLORITO

A fração F2 foi oxidada com NaClO₂ com o objetivo de verificar se esta reação poderia oxidar outros grupos funcionais presentes nas ulvanas, como por exemplo, as hidroxilas primárias. A reação com NaClO₂ é específica para grupos aldeído. No entanto, ela forma como subproduto o NaClO, o qual poderia oxidar outros pontos na cadeia polissacarídica (WICHA; ZARECKI, 1974; STEVENS; CHAPMAN; WELLER, 1980) Portanto, com o objetivo de verificar se as condições realizadas para a reação com clorito poderiam oxidar outros grupos funcionais das ulvanas, ou provocar despolimerização, as ulvanas nativas presentes em F2 foram oxidadas com 6 equivalentes de NaClO₂ a 10 °C originando a fração F2oxC.

6.7.1 Análises de RMN de ^{13}C da fração F2oxC

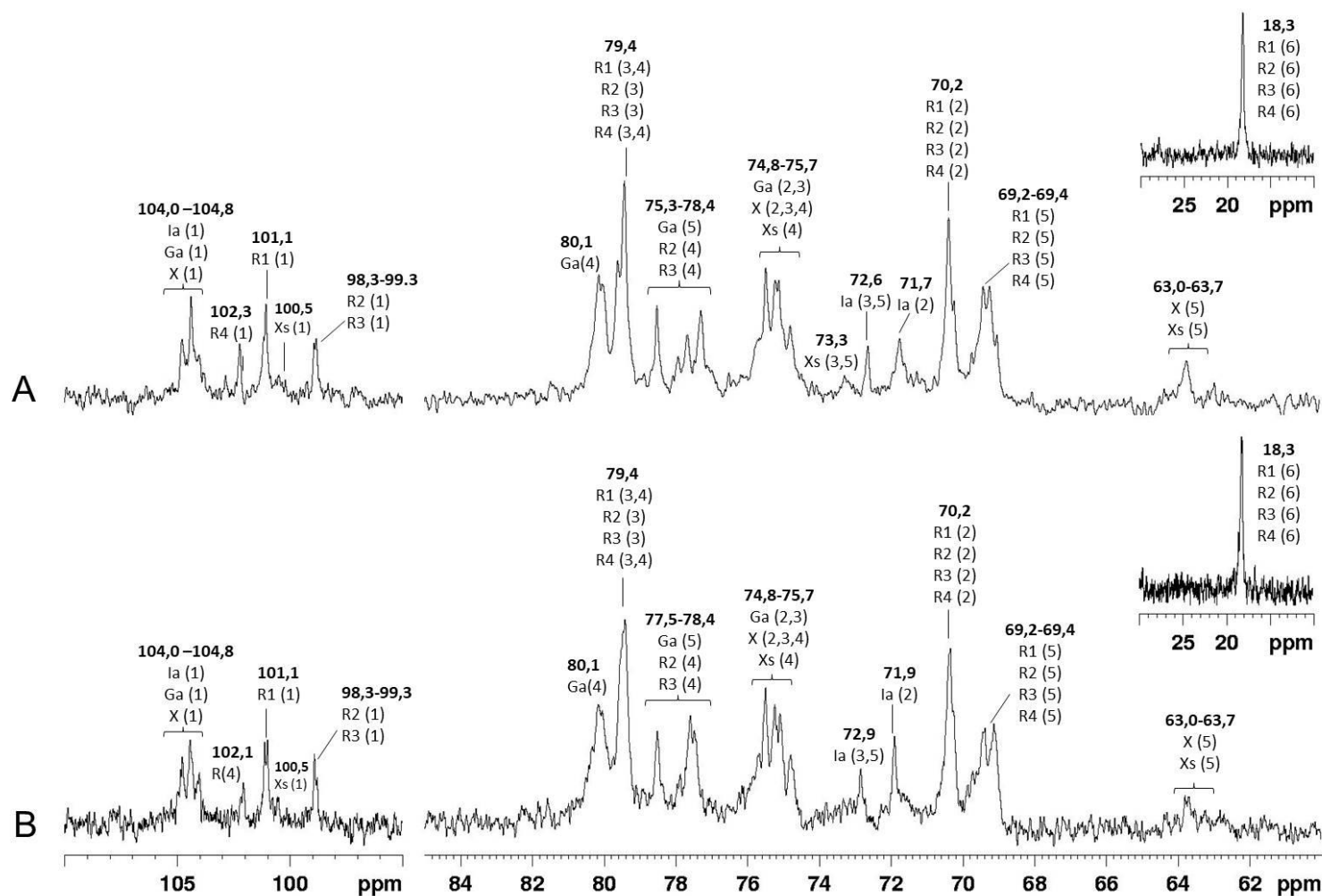
A fração F2oxC foi analisada por RMN de ^{13}C e seu espectro foi comparado com o espectro da fração F2. A análise de RMN de ^{13}C mostrou que a fração F2oxC é constituída pelas mesmas díades presentes na fração F2. Não foram observados sinais referentes ao carbono da carbonila de cetonas ou ésteres. (Figuras 38 e 39). Portanto, a reação com clorito não afeta outros grupos funcionais presentes nas ulvanas nativas.

FIGURA 38 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (210-60 PPM) DE F2 (A) E F2oxC (B)



Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 39 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C (110-60 PPM E 30-10 PPM) DE F2 (A) E F2oxC (B)



Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

6.8 OXIDAÇÃO DAS ULVANAS DIALDEÍDICAS P1, P2, P3 E R-P3 COM CLORITO EM ESCALA PREPARATIVA

Com a finalidade de obter ulvanas policarboxiladas, as frações P1, P2, P3 e R-P3 foram submetidas à oxidação com clorito de sódio conforme otimizado nos experimentos em escala analítica, originado as frações C1, C2, C3 e R-C3 respectivamente. O material recuperado, em relação ao material inicial submetido à oxidação com clorito foi de 80,0, 72,0, 87,0 e 100,0% para C1, C2, C3 e R-C3 respectivamente.

A determinação do teor de grupos carboxila presentes nas frações obtidas após a oxidação com clorito foi realizada por titulação ácido-base. Estes valores foram comparados com aqueles obtidos para as ulvanas nativas (F2), carboxi-reduzidas (R), dialdeídicas (P1, P2 e P3) e carboxi-reduzidas dialdeídicas (R-P3) e estão representados na tabela 14.

TABELA 14 - TITULAÇÃO DOS GRUPOS CARBOXÍLICOS PRESENTES NA FRAÇÃO NATIVA E DE SEUS PRODUTOS OXIDADOS

Fração	COOH (mmol.g ⁻¹)
F2	0,36
P1	0,38
C1	1,20
P2	0,36
C2	1,41
P3	0,38
C3	1,81
R-P3	0,09
R-C3	1,86

O teor de grupos carboxila por grama de polissacarídeo variou entre 1,20 a 1,86 mmol.g⁻¹ para as frações C1, C2, C3 e R-C3. Este teor aumentou de acordo com o tempo em que as ulvanas foram previamente submetidas à clivagem oxidativa com periodato de sódio. Desta maneira, a oxidação com clorito de ulvanas dialdeídicas originou ulvanas policarboxílicas com diferentes teores de grupos carboxila.

6.8.1 Análises químicas e composição monossacarídica das ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3

As análises químicas dos produtos obtidos após a oxidação com NaClO₂, em comparação com as suas frações de origem, estão representados na tabela 15.

TABELA 15 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS ULVANAS DIALDEÍDICAS (P1, P2 E P3) E POLICARBOXÍLICAS (C1, C2 E C3)

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos (%) ^a	Ácidos urônicos (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Proteína (%) ^d	[α] _D ²⁵
P1	88,0 ^e	54,5	14,1	20,4	2,0	-51,2
C1	80,0 ^f	45,8	16,4	19,7	2,3	-43,2
P2	100,0 ^e	53,1	13,8	21,0	2,4	-34,4
C2	72,0 ^f	45,4	13,8	21,3	1,5	-47,7
P3	91,0 ^e	51,1	12,5	21,2	3,0	-58,6
C3	87,0 ^f	39,8	13,2	21,0	Tr.	-55,2
R-P3	75,0 ^e	45,3	2,3	19,0	3,8	-56,8
R-C3	100,0 ^f	40,6	2,8	22,7	2,4	-71,6

Tr. = traços. ^a Dubois *et al.*, 1956. ^b Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^c Dodgson; Price, 1962. ^d Lowry *et al.*, 1951. ^e Material recuperado após a oxidação com periodato. ^f Material recuperado após a oxidação com clorito

Os teores de carboidratos totais das ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3 (39,8-45,8%) foram menores quando comparados com as ulvanas dialdeídicas P1, P2 e P3 (51,1 a 54,4%), respectivamente. Esta diminuição também foi observada

para as ulvanas carboxi-reduzidas policarboxílicas R-C3 em comparação às ulvanas carboxi-reduzidas dialdeídicas R-P3.

A diminuição no teor de carboidratos totais foi atribuída, em parte, à oxidação dos grupos aldeídos das unidades redutoras a ácidos carboxílicos. Os terminais redutores na forma carboxílica não formariam furfural e, portanto, não seriam identificados pela metodologia de dosagem de carboidratos totais. Já os teores de urônicos (13,2-16,4%) e sulfato (19,7-21,3%) foram similares aos de suas frações de origem, indicando que a oxidação com clorito não afeta as unidades de ácido urônico e nem as unidades sulfatadas. Os teores de proteína foram abaixo de 3,8% para todas as frações. A rotação óptica variou entre -71,6 a -43,2 para as ulvanas policarboxílicas.

A composição monossacarídica de C1, C2, C3 e R-C3 também se apresentou similar quando comparado com P1, P2, P3 e R-P3 (Tabela 6) respectivamente. Estes dados estão representados na tabela 16.

TABELA 16 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C1, C2 E C3 E DE SEUS PRODUTOS CARBOXI-REDUZIDOS

Fração	Rendimento (%)	Ácidos urônicos (%) ^a	Monossacarídeos (mol%)						
			Rha	Xyl	Gal	3-Me-O-Gal ^b	Glc ^c	Glc ^d	Ido ^e
C1	80,0 ^f	16,4	61,0	19,8	Tr.	2,2	16,6	n.d.	-
C1-R	95,0 ^g	2,3	52,4	12,8	2,9	3,1	3,9	24,8	-
C2	72,0 ^f	13,8	77,9	11,4	1,5	2,4	6,8	n.d.	-
C2-R	86,0 ^g	3,2	56,1	9,7	1,4	3,5	4,1	26,2	-
C3	87,0 ^f	13,2	85,3	7,6	Tr.	4,4	3,9	n.d.	-
C3-R	82,0 ^g	1,6	62,1	8,2	-	2,3	2,7	24,7	-
R-C3	100,0 ^f	2,8	63,2	11,9	4,4	7,2	7,9	5,5	-

- = Não detectado. ^a Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^b Identificado pela presença do íon 130 m/z. ^c Identificado na forma de glucitol-hexaacetato (íon 217 m/z). ^d Identificado na forma de 1,6,6-trideutério-glucitol-hexaacetato (íon 219 m/z). ^e Identificado na forma de derivado 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose. ^f Material recuperado após a oxidação com clorito. ^g Material recuperado após a carboxi-redução.

Com a finalidade de determinar a composição monossacarídica incluindo os ácidos urônicos, as ulvanas oxidadas com clorito foram carboxi-reduzidas (TAYLOR; CONRAD, 1972). Os rendimentos após carboxi-redução e o teor de ácidos urônicos determinado por método colorimétrico (FILISETTI-COZZI; CARPITA, 1991) estão representados na tabela 16. O processo de carboxi-redução foi de 77 a 88%. A composição monossacarídica das ulvanas oxidadas com clorito foi similar as suas respectivas frações oxidadas com periodato (Tabela 16). Estes dados demonstram que a oxidação com clorito não ocasionou modificações perceptíveis na composição monossacarídica de ulvanas.

6.8.2 Análise de RMN de ^{13}C das ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3

As ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3 foram analisadas por RMN de ^{13}C , ^1H , HSQC e HMBC (Figuras 40-44). Os deslocamentos químicos presentes nestas frações estão representados na tabela 17.

Na análise de RMN de ^{13}C de C1, C2 e C3 foi possível observar um aumento na intensidade dos sinais entre 173-176 ppm em relação as suas frações de origem. Estes sinais foram atribuídos aos carbonos dos grupos carboxila em C-2 e C-3 (Figura 40).

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou os sinais referentes ao C-1 das unidades de β -D-ácido glucurônico e β -D-xilose 2-sulfato em 104,3 e 100,5 ppm respectivamente. Também foi observado o C-1 das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato das díades A_{3s} e $U_{2's,3s}$ em 101,2 e 99,3 ppm respectivamente (Figura 41).

Considerando que a oxidação com periodato originou ulvanas contendo os derivados 2,3-dialdeído-xilose, é esperado que após a oxidação com clorito haja a formação dos derivados 2,3-dicarboxil-xilose. A nova díade formada contendo xilose dicarboxílica foi denominada U_{3soxC} . No espectro de RMN de ^{13}C , o sinal em 101,5 ppm foi atribuído ao C-1 das unidades de 2,3-dicarboxil-xilose. No espectro de HSQC (Figura 42), o C-1 em ~101,5 ppm correlaciona com os hidrogênios em 4,82, 4,90, 4,95, 4,98 e 5,19 ppm. Portanto, devido a sobreposição dos sinais, não foi possível assinalar o H-1 dos derivados de xilose dicarboxílicas.

As análises químicas das ulvanas previamente oxidadas com periodato também mostraram que houve 100% de oxidação das unidades de ácido idurônico. Em menor proporção também ocorreu a oxidação das unidades de ácido glucurônico. Portanto, a oxidação com clorito também originou os derivados 2,3,6-tricarboxil-ácido urônico. A correlação anomérica no espectro de HSQC em 103,2/4,81 ppm foi atribuída às unidades de ácidos urônicos oxidados.

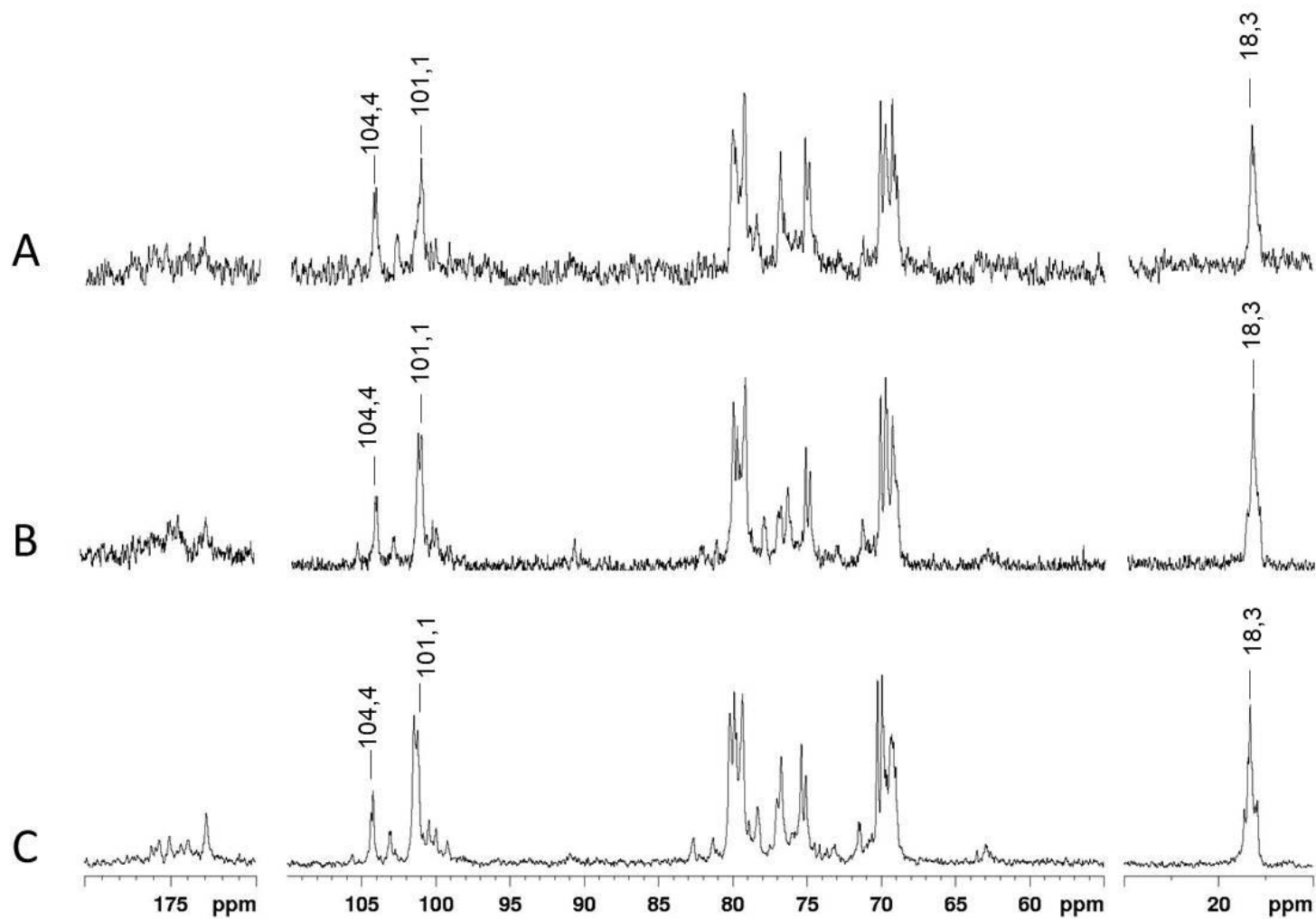
No espectro de HMBC (Figura 44) da fração C3 foram observadas as correlações em 174,0/4,70 e 174,0/4,60 ppm. Os sinais em 4,70 e 4,60 ppm correlacionam no espectro de HSQC (Figura 43) com o sinal em 79,4 ppm. Portanto, o sinal do C-4 dos derivados de xilose 2,3-dicarboxílica e ácidos urônicos 2,3,6-tricaroxílicos foram assinalados em 79,4 ppm.

O C-1/H-1 das unidades de ramnose adjacentes aos derivados de xilose e ácidos urônicos oxidados foram assinalados em 101,2-101,55/4,96-5,00 ppm.

Não foram observadas no espectro de HSQC das frações C1, C2 e C3, as correlações referentes às unidades redutoras de xilose 2-sulfato e ramnose 3-sulfato, as quais estavam presentes nos espectros de P1, P2 e P3. Este dado sugere que também houve oxidação dos terminais redutores. Devido a sobreposição dos sinais, as correlações dos derivados carboxilados provenientes de terminais redutores não foram identificadas.

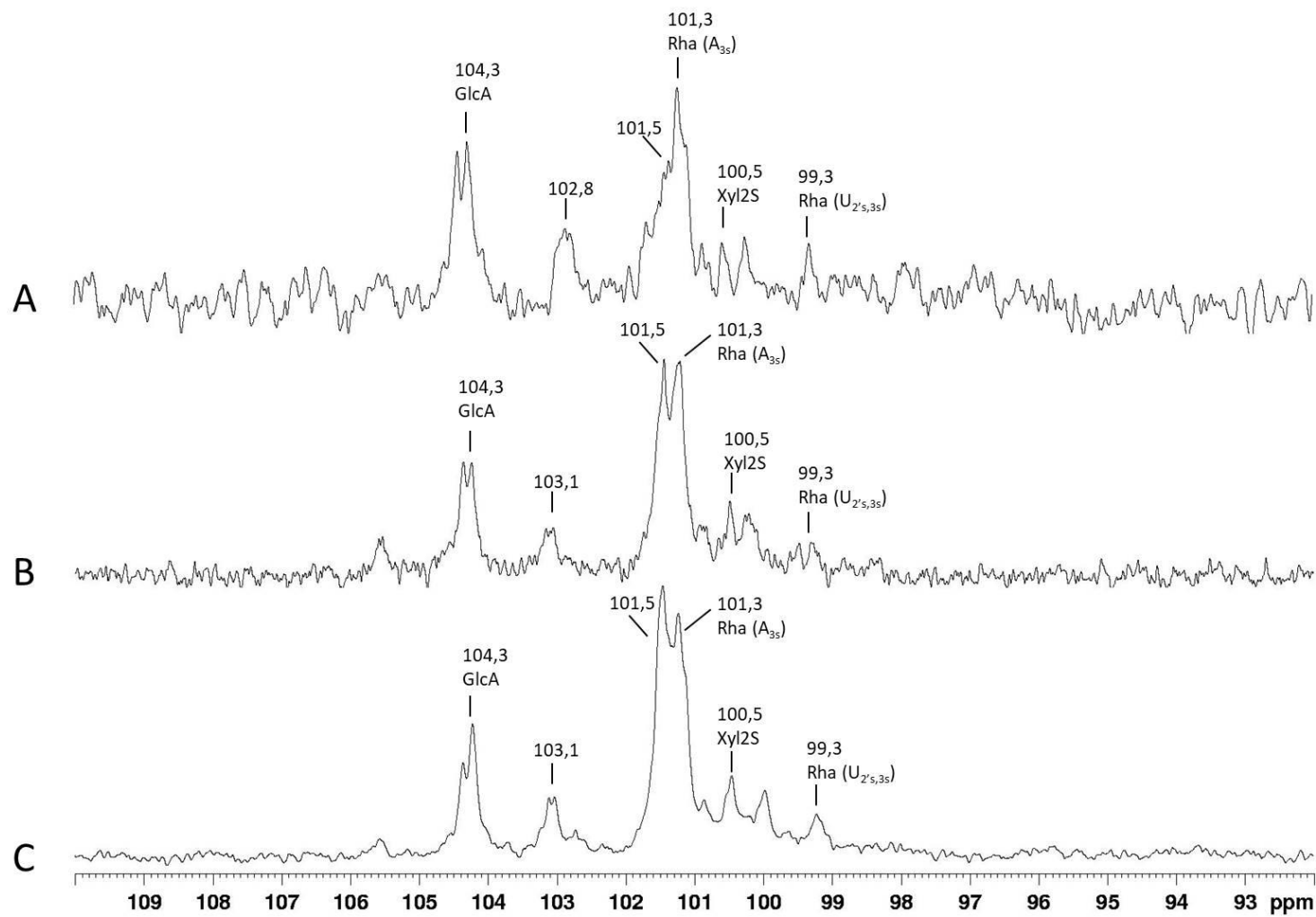
O espectro de HSQC de C1, C2 e C3 mostrou a presença da correlação em 89,0/5,09 ppm, a qual foi atribuída à presença hemiacetais cíclicos resistentes à oxidação com clorito. A presença de hemiacetais resistentes à oxidação também já foi observada para a oxidação de celulose dialdeídica. Sirviö *et al.* (2014) oxidaram com clorito celuloses dialdeídicas as quais apresentavam 1,68 mmol.g⁻¹ de aldeído. Os autores observaram que usando um excesso de clorito de 5 equivalentes e com meia hora de reação, o conteúdo de carboxila era de 1,41 mmol.g⁻¹. Quando o tempo de reação foi aumentado para 20 h, não foi observado um aumento significativo do teor de carboxila.

FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C1 (A), C2 (B) e C3 (C)



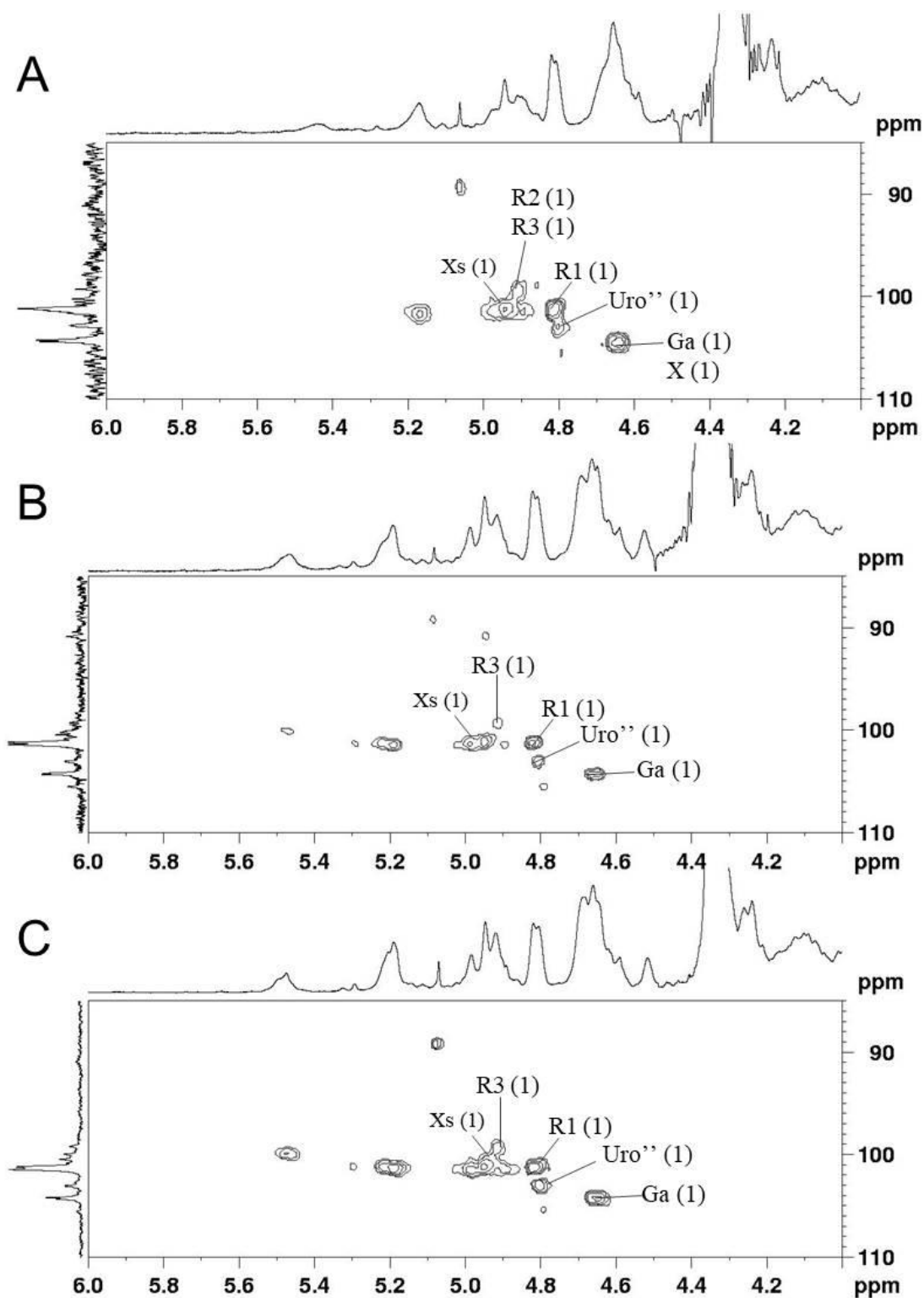
Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (REGIÃO DE 110-92 PPM) DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS C1 (A), C2 (B) e C3 (C)



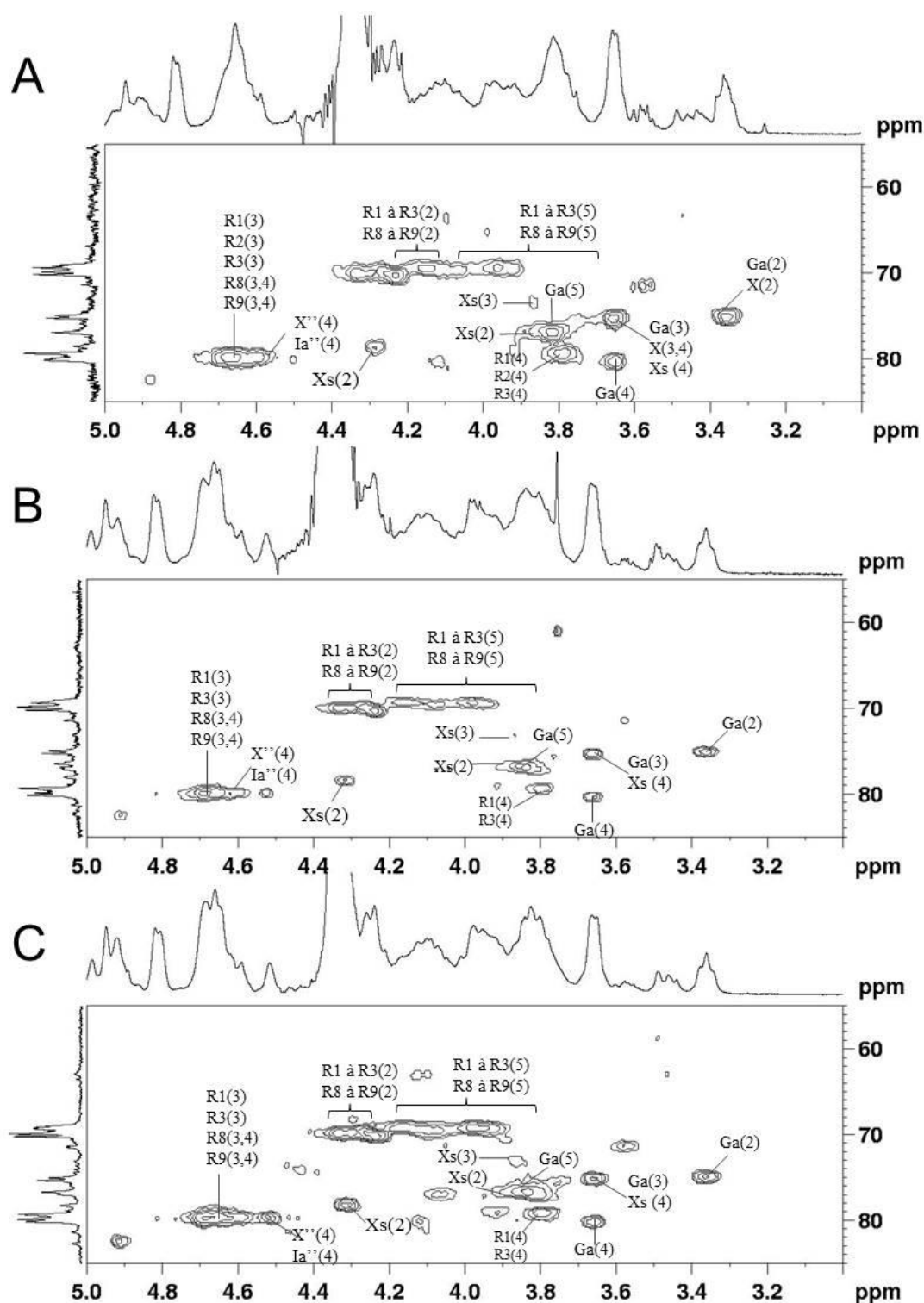
Nota: C1 (A), C2 (B) E C3 (C). Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 42- ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO ANOMÉRICA) DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS C1 (A), C2 (B) e C3 (C)



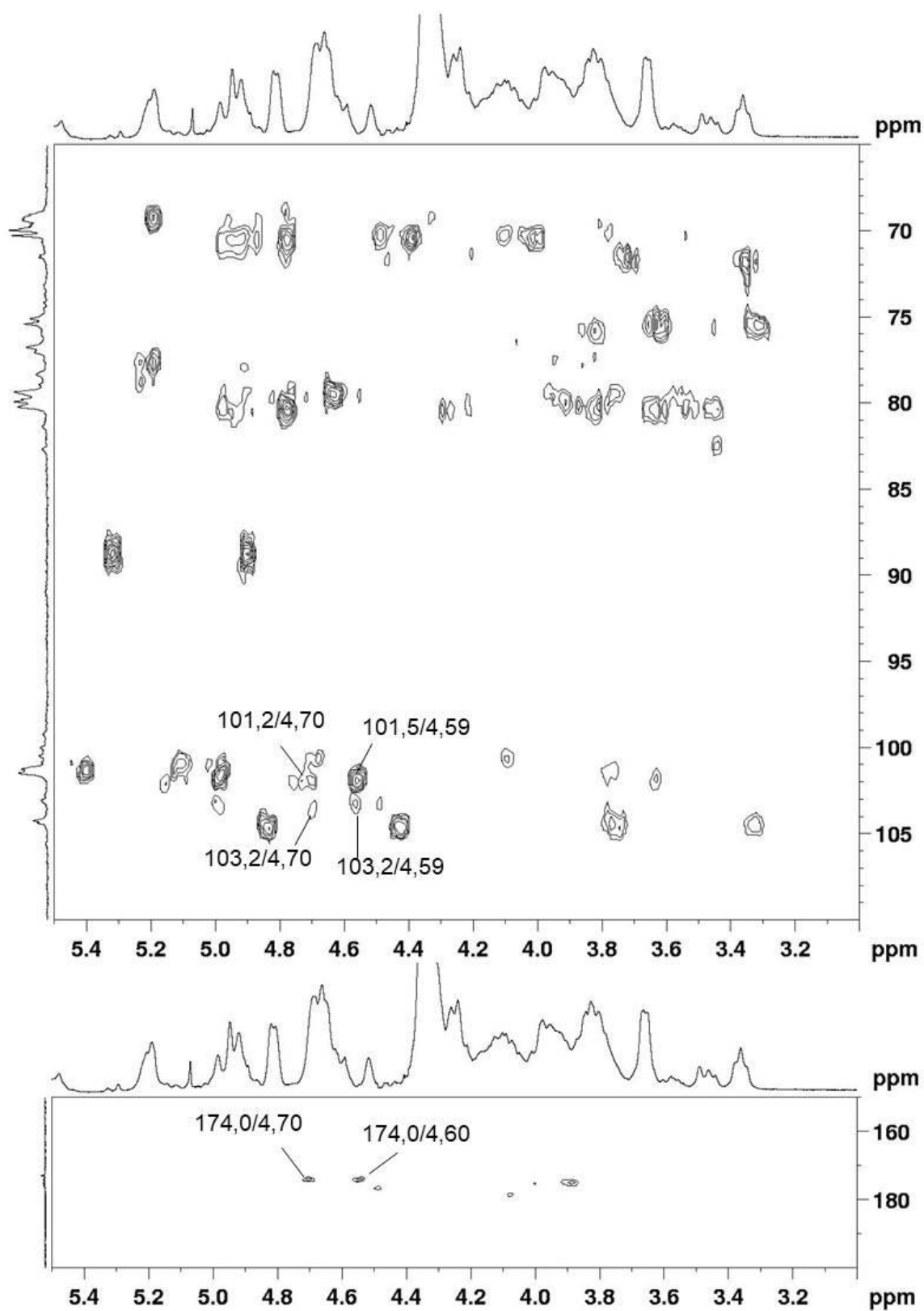
NOTA: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm). Ga e R1 = β -D-ácido glucurônico e α -L-ramnose de $\text{A}_{3\text{S}}$; X e R2 = β -D-xilose e α -L-ramnose de $\text{U}_{3\text{S}}$; Xs e R3 = β -D-xilose 2-sulfato e α -L-ramnose de $\text{U}_{2'\text{S},3\text{S}}$; Uro'' 2,3,6-tricarboxil-ácido urônico. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 43 - ESPECTRO DE HSQC (REGIÃO DE 85-65 E 5,0-3,0 PPM) DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS C1 (A), C2 (B) e C3 (C)



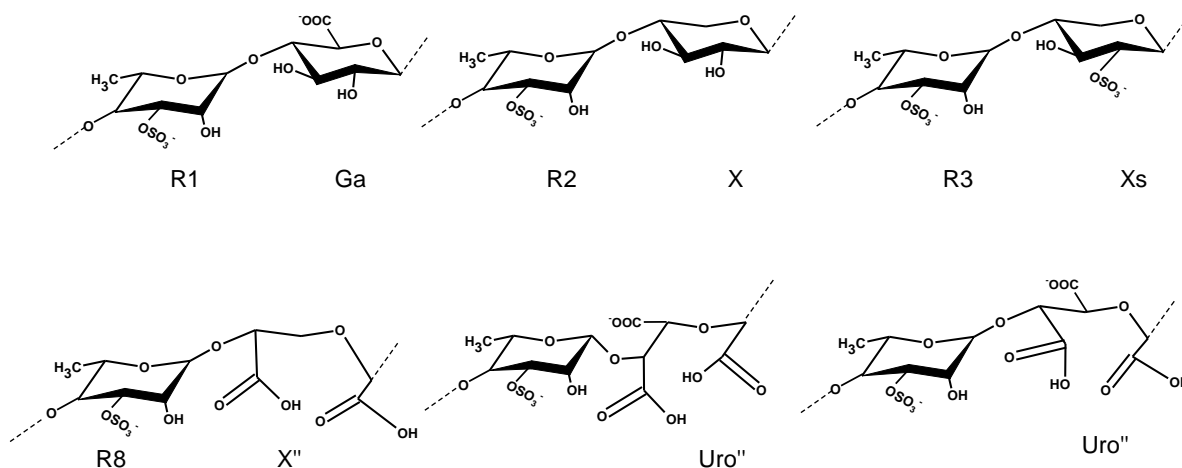
NOTA: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm). Ga e R1 = β -D-ácido glucurônico e α -L-ramnose de $\text{A}_{3\text{S}}$; X e R2 = β -D-xilose e α -L-ramnose de $\text{U}_{3\text{S}}$; Xs e R3 = β -D-xilose 2-sulfato e α -L-ramnose de $\text{U}_{2'\text{S},3\text{S}}$; X'' e R8 = 2,3-dicarboxil-xilose e α -L-ramnose de $\text{U}_{3\text{S}\text{OXC}}$; Ia'' e R7 = 2,3,6-tricarboxil-ácido idurônico e α -L-ramnose de Uro_{OXC} . Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 44 - ESPECTRO DE HMBC DA FRAÇÃO C3



NOTA: Solvente = D_2O . Temperatura = 70°C . Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm).

TABELA 17 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS



Unidade	Díade	C-1/H-1	C-2/H-2	C3-H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
Ga	A _{3s}	104,4/4,64	75,2/3,35	75,5/3,65	80,1/3,65	77,0/3,79	~175,3
R1		101,1/4,82	70,4/4,24	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
Xs	U _{2's,3s}	100,5/4,97	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,77	63,1	
R3		99,3/4,92	70,3/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,4/4,05	~18,2/1,33
X''	U _{3soxC} ^{a,b,c}	101,3	~173	~173	~79,4		
R8		101,5					
Uro''	^{a,b,c}	103,1/4,81	~173	~173	~79,4		~175,3

^a Presente em C1. ^b Presente em C2. ^c Presente em C3

Com base nos dados das análises químicas, de composição monossacarídica e das análises de RMN dos produtos obtidos após a oxidação com periodato e periodato-clorito foi possível inferir que as ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3 são formadas majoritariamente pelas díades: A_{3s}, U_{3s}, U_{2's,3s}, U_{3soxC}, além da presença das díades contendo ácidos urônicos policarboxílicos. Para a fração C3 não foram observados sinais das unidades de xilose 2-sulfato e ramnose 3-sulfato como terminais redutores, os quais estavam presentes na fração P3. Portanto, este dado

sugere que os grupos aldeído das unidades redutoras foram oxidados a ácidos carboxílicos através da reação com clorito de sódio.

6.9 DESSULFATAÇÃO DA ULVANA NATIVA F2 E POLICARBOXÍLICA C3

A presença de grupos sulfato é essencial para a atividade anticoagulante. Polissacarídeos neutros, quando persulfatados, passam a apresentar atividade anticoagulante, como já descrito para β -(1 \rightarrow 4)-xilanas, β -(1 \rightarrow 4)-glucanas (celulose), α -(1 \rightarrow 4)-glucanas (amilose) e β -(1 \rightarrow 3)-glucanas (CHAIDEDGUMJORN *et al.*, 2002).

Para polissacarídeos naturalmente sulfatados, o aumento no teor destes grupos via sulfatação química também pode aumentar a atividade anticoagulante já apresentada por estes polímeros. Ulvanas quimicamente sulfatadas apresentaram atividade anticoagulante duas vezes maior quando comparadas com o polímero nativo (WANG *et al.*, 2013).

Considerando que os grupos sulfato também podem influenciar a atividade anticoagulante das ulvanas policarboxílicas de *U. fasciata* obtidas neste trabalho, as frações F2 e C3 foram selecionadas para determinar a influência dos grupos sulfato na atividade anticoagulante. Com este intuito, essas frações foram submetidas ao processo de dessulfatação solvolítica (NAGASAWA; INOE; TOKUYASU, 1979), originando as frações D e C3-D (Figura 45).

Os rendimentos e as análises químicas e F2, C3 e de seus respectivos produtos dessulfatados estão representados na tabela 18. O processo de dessulfatação foi efetivo na remoção de grupos sulfato (70,9 e 100,0% para as frações D e C3-D, respectivamente) e com rendimento de 77,0 e 54,0% em relação ao material inicial para D e C3-D respectivamente.

FIGURA 45 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DESSULFATAÇÃO DA ULVANA NATIVA F2 (A) E POLICARBOXÍLICA (C3)

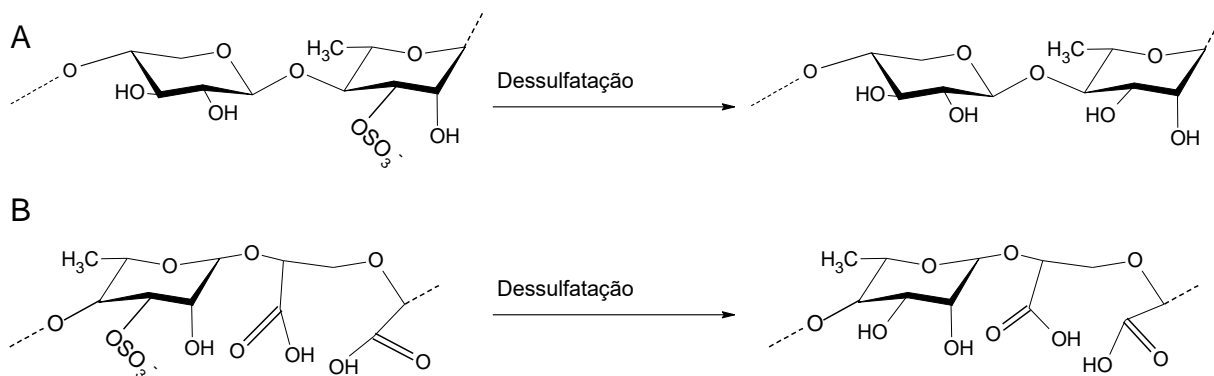


TABELA 18 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES F2 E C3 E DE SEUS PRODUTOS DESSULFATADOS

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos totais (%) ^a	Ácidos urônicos ^b (%)	Sulfato (%) ^c	Proteína (%) ^d
F2	10,0 ^e	66,3	22,4	20,6	2,9
D	77,0 ^f	66,5	21,9	6,0	2,7
C3	87,0 ^g	39,8	13,2	21,0	Tr.
C3-D	54,0 ^f	37,4	11,1	-	2,1

- = não detectado. Tr. = traços. ^a Dubois *et al.*, 1956. ^b Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^c Dodgson; Price, 1962. ^d Lowry *et al.*, 1951. ^e Em relação à alga seca e moída. ^f Material recuperado após a dessulfatação. ^g Material recuperado após a oxidação com clorito.

A análise comparativa da composição monossacarídica de D e C3-D foi semelhante às suas respectivas frações de origem, indicando que não houve degradação no processo de dessulfatação (Tabela 19).

TABELA 19 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES F2 E C3 E DE SEUS PRODUTOS DESSULFATADOS

Fração	Monossacarídeos (mol%)				
	Rha	Xyl	Gal	3-Me-O-Gal ^a	Glc
F2	59,0	26,0	2,1	3,5	9,8
D	57,7	25,2	4,2	1,0	11,0
C3	85,3	7,6	Tr.	4,4	3,9
C3-D	85,4	6,0	1,6	22	4,9

^a Identificado pela presença do íon 130 m/z.

6.10 FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL DA ULVANA POLICARBOXÍLICA C3

Dentre as ulvanas policarboxílicas, C3 foi selecionada para fracionamento em DEAE-Sephacel desde que esta apresenta maior teor de grupos carboxila. A ulvana policarboxílica C3 foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna contendo DEAE-Sephacel na forma Cl⁻, visando o fracionamento do produto modificado.

6.10.1 Análises químicas e composição monossacarídica das subfrações obtidas após cromatografia de troca iônica da fração C3

O rendimento total obtido das frações recuperadas da cromatografia de troca iônica foi de 80,0% relativo à massa inicial aplicada na coluna. As frações de maior rendimento foram as eluídas com NaCl 0,5 mol.L⁻¹ (C3b), seguida da fração eluída com NaCl 1 mol.L⁻¹ (C3c) com 13,0 e 81,0% de rendimento em relação ao material recuperado da coluna, respectivamente (Tabela 20).

TABELA 20 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA ULVANA POLICARBOXÍLICA C3 E DE SUAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos totais (%) ^a	Ácidos urônicos (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Proteína (%) ^d	[α] _D ²⁵	COOH (mmol.g ⁻¹)
C3	87,0 ^e	39,8	13,2	21,0	Tr.	-55,2	1,81
C3a	1,9 ^f	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C3b	13,0 ^f	61,6	8,1	14,1	4,4	-7,6	1,23
C3c	81,0 ^f	33,2	13,8	25,0	Tr.	-44,1	2,10
C3d	4,0 ^f	26,1	8,7	23,5	n.d.	n.d.	n.d

n.d. = não determinado. Tr. = traços. ^a Dubois *et al.*, 1956. ^b Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^c Dodgson; Price, 1962. ^d Lowry *et al.*, 1951. ^e Material recuperado após a oxidação com clorito. ^f Em relação ao material recuperado da coluna.

Dentre as frações de maior rendimento, C3c apresentou maior teor de grupos sulfato (25,0%), urônicos (13,8%) e carboxila (2,10 mmol.g⁻¹) quando comparada com C3b (14,1%, 8,1% e 1,23 mmol.g⁻¹ de sulfato, urônicos e COOH respectivamente). (Tabela 20). O teor de proteína para todas as frações foi abaixo de 4,4%. A rotação óptica variou de -55,2 para -7,6.

A análise da composição monossacarídica de C3b e C3c (Tabela 21) mostrou que ambas as frações apresentam como principais monossacarídeos neutros ramnose, xilose e glucose, em diferentes proporções.

TABELA 21 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA ULVANA POLICARBOXÍLICA C3 E DE SUAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL

Fração	Monossacarídeos (mol%)				
	Rha	Xyl	Gal	3-Me-O-Gal ^a	Glc
C3	85,3	7,6	Tr.	4,4	3,9
C3b	54,2	23,7	-	-	22,1
C3c	72,3	13,8	1,6	-	12,3

- = não identificado. Tr. = traços. ^a Identificado pela presença do íon 130 m/z

6.10.2 Carboxi-redução das ulvanas policarboxílicas C3c

Com o objetivo de identificar e quantificar os ácidos urônicos presentes na fração C3c, esta foi carboxi-reduzida originando a fração C3c-R, a qual apresentou 82,6% de carboxi-redução (Tabela 22).

A análise de composição monossacarídica C3c-R mostrou um aumento no teor de glucitol hexaacetato em relação a C3c de 12,3 para 26,4 mol%. Deste derivado, 79,9 mol% corresponde ao derivado 1,6,6-trideutério -glucitol hexaacetato. Este valor corresponde a 21,1 mol% de unidades de β -D-ácido glucurônico na fração C3c.

TABELA 22 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C3c E C3c-R

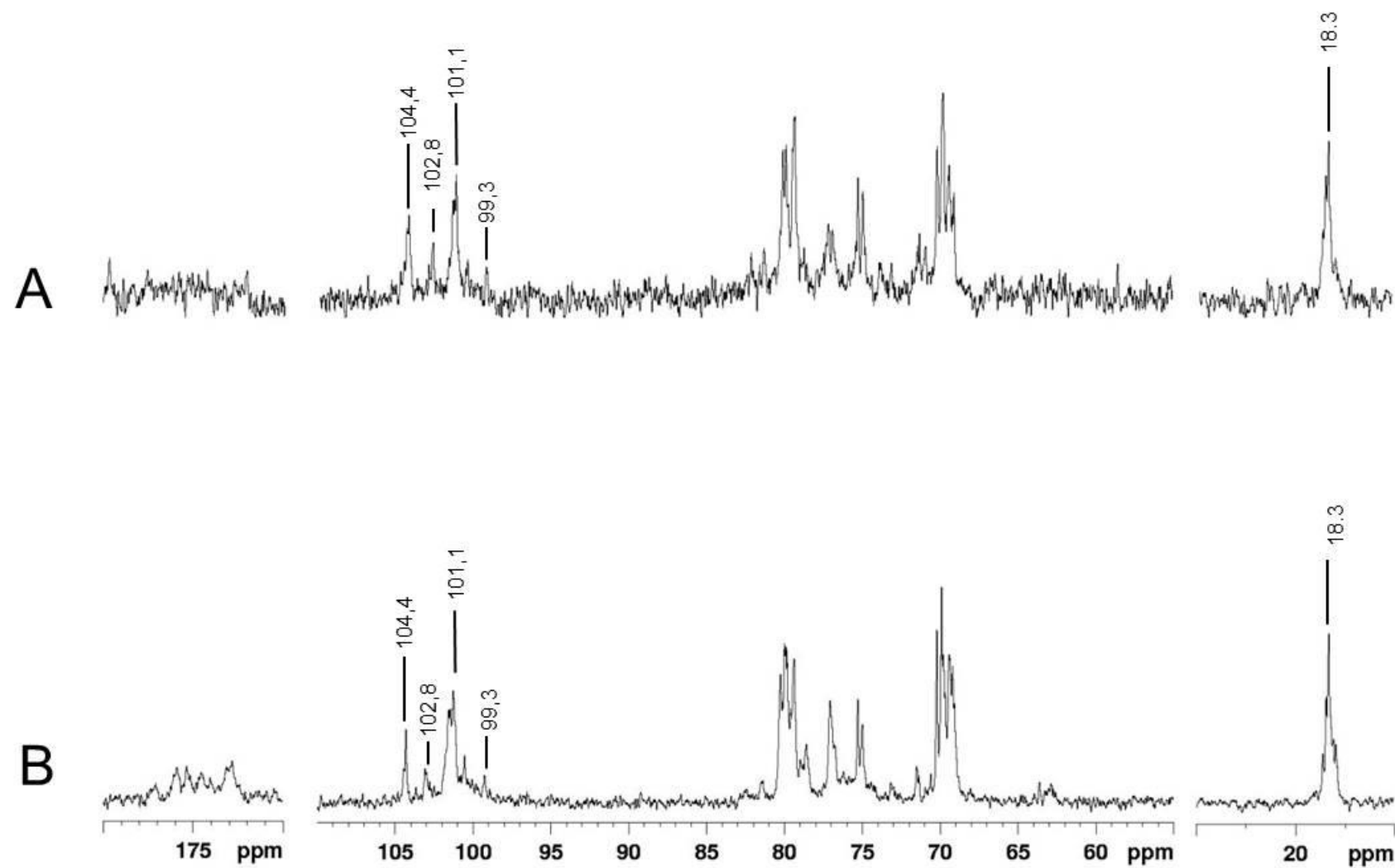
Fração	Rendimento (%)	Ácidos urônicos (%) ^a	Monossacarídeos (mol%)						
			Rha	Xyl	Gal	3-Me-O-Gal ^b	Glc ^c	Glc ^d	Ido
C3c	81,0 ^e	13,8	72,3	13,8	-	1,6	12,3	-	-
C3c-R	100,0 ^f	2,4	66,1	6,5	-	Tr.	5,3	21,1	-

- = não identificado. Tr. = traços. ^a Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991. ^b Identificado pela presença do íon 130 m/z. ^c Identificado na forma de glucitol-hexaacetato (íon 217 m/z), ^d Identificado na forma de 1,6,6-trideutério-glucitol-hexaacetato (íon 219 m/z). ^e Material recuperado após a oxidação eluição em DEAE-Sephacel 1,5 mol.L⁻¹. ^f Material recuperado após a carboxi-redução.

6.10.3. Análises de RMN das ulvanas policarboxílicas C3b e C3c

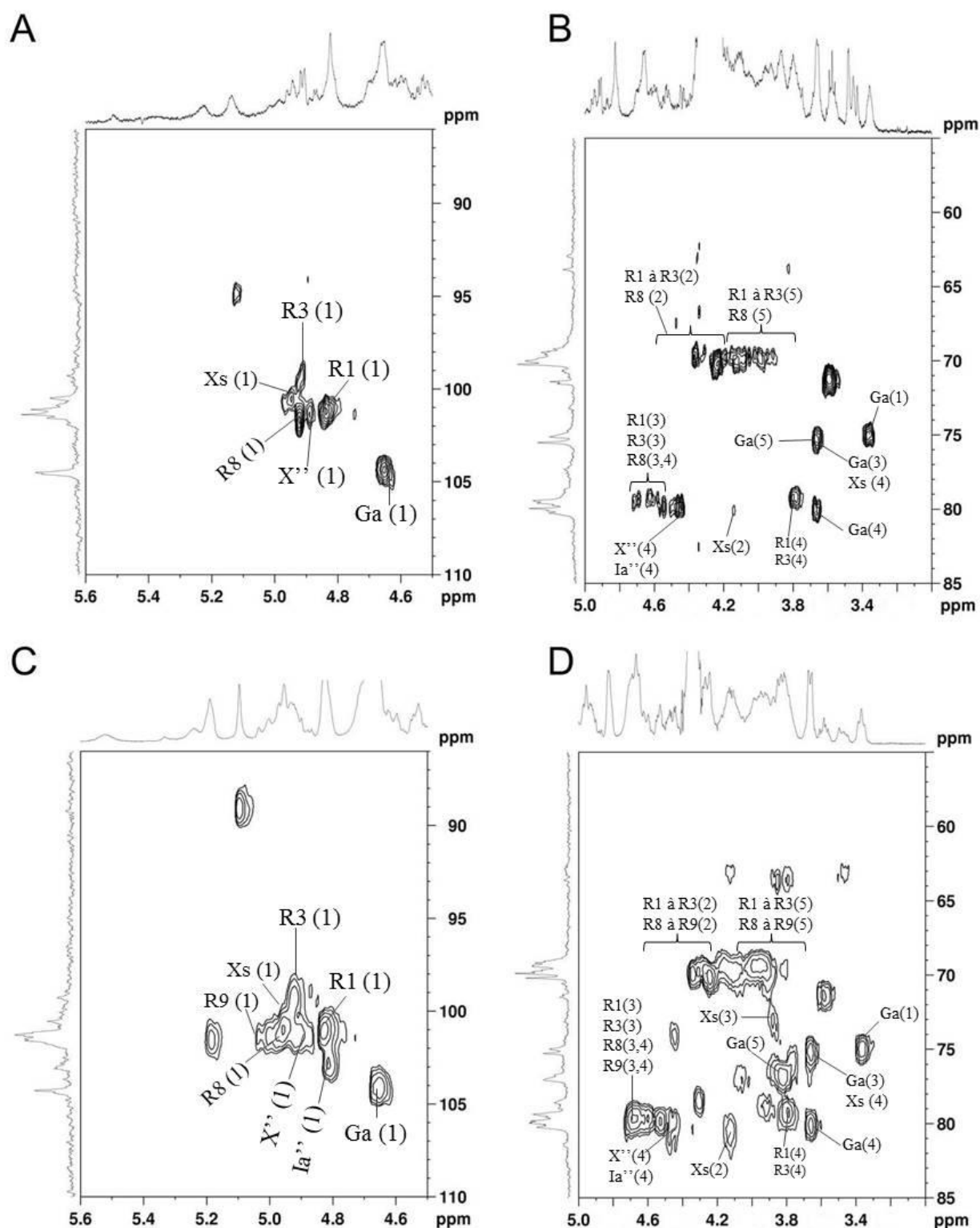
As frações C3b e C3c foram analisadas por RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC (Figuras 46 e 47). Essas análises mostraram que estas frações são constituídas pelas díades $\text{A}_{3\text{s}}$ e $\text{U}_{2'\text{s},3\text{s}}$. C3b e C3c também apresentaram a correlação em 71,5/3,58 ppm, referentes ao C-4/H-4 das unidades de ramnose 3-sulfato com terminal não redutor. Portanto, estas díades também devem conter derivados carboxilados provenientes da oxidação dos grupos aldeído dos terminais redutores. Adicionalmente, C3c apresentou correlações referentes às díades $\text{U}_{3\text{soxC}}$ e da díade contendo os derivados 2,3,6-tricarboxil-ácidos urônicos. Os deslocamentos químicos das díades presentes nas frações C3b e C3c estão representados na tabela 23.

FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C3b (A) E C3c (B)



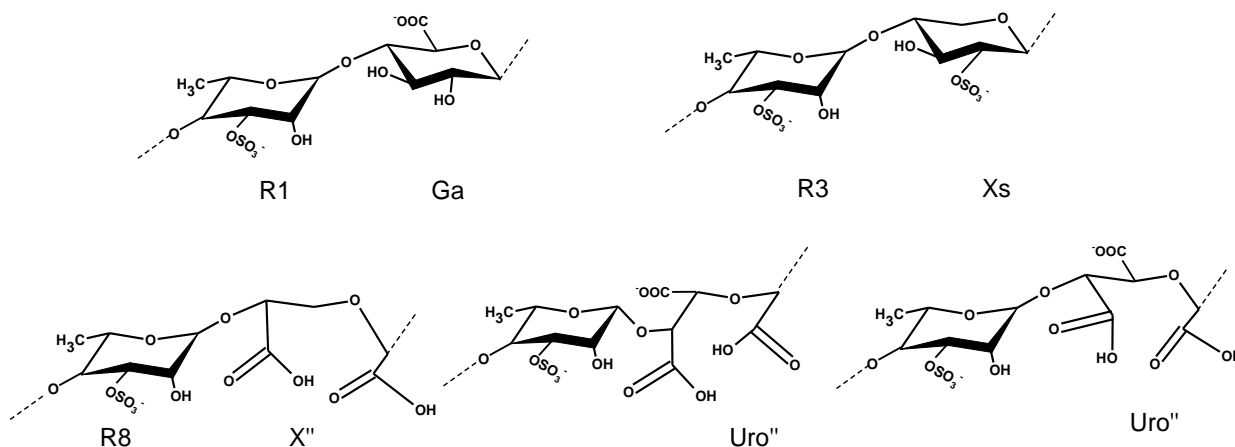
Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 47 - ESPECTRO DE HSQC DAS FRAÇÕES C3b (A) E C3c (B)



NOTA: Solvente = D_2O . Temperatura = 70 °C. Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm). Ga e R1 = β -D-ácido glucurônico e α -L-ramnose de $\text{A}_{3\text{S}}$; Xs e R3 = β -D-xilose 2-sulfato e α -L-ramnose de $\text{U}_{2\text{S},3\text{S}}$; X'' = derivado 2,3-dicarboxil-xilose de $\text{U}_{3\text{SOXC}}$; Uro'' = 2,3,6-tricarboxil-ácido urônico. Os números em parênteses representam o posicionamento do carbono.

TABELA 23 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) PRESENTES NOS ESPECTROS DE RMN DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS C3b E C3c



Unidade	Díade	C-1/H-1	C-2/H-2	C3-H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H-6
Ga	A _{3s}	104,3/4,64	75,2/3,35	75,5/3,65	80,1/3,65	77,0/3,79	~175,3
R1		101,1/4,82	70,4/4,24	79,4/4,63	79,4/3,79	69,4/4,15	~18,2/1,33
Xs	U _{2's,3s}	100,5/4,97	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,77	63,1	
R3		99,3/4,92	70,3/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,4/4,05	~18,2/1,33
X''	U _{3soxC}	101,3	~173	~173	~79,4		
R8		101,5					
Uro''		102,8/4,81 ^a 103,1/4,81 ^b	~173	~173	~79,4		~175,3

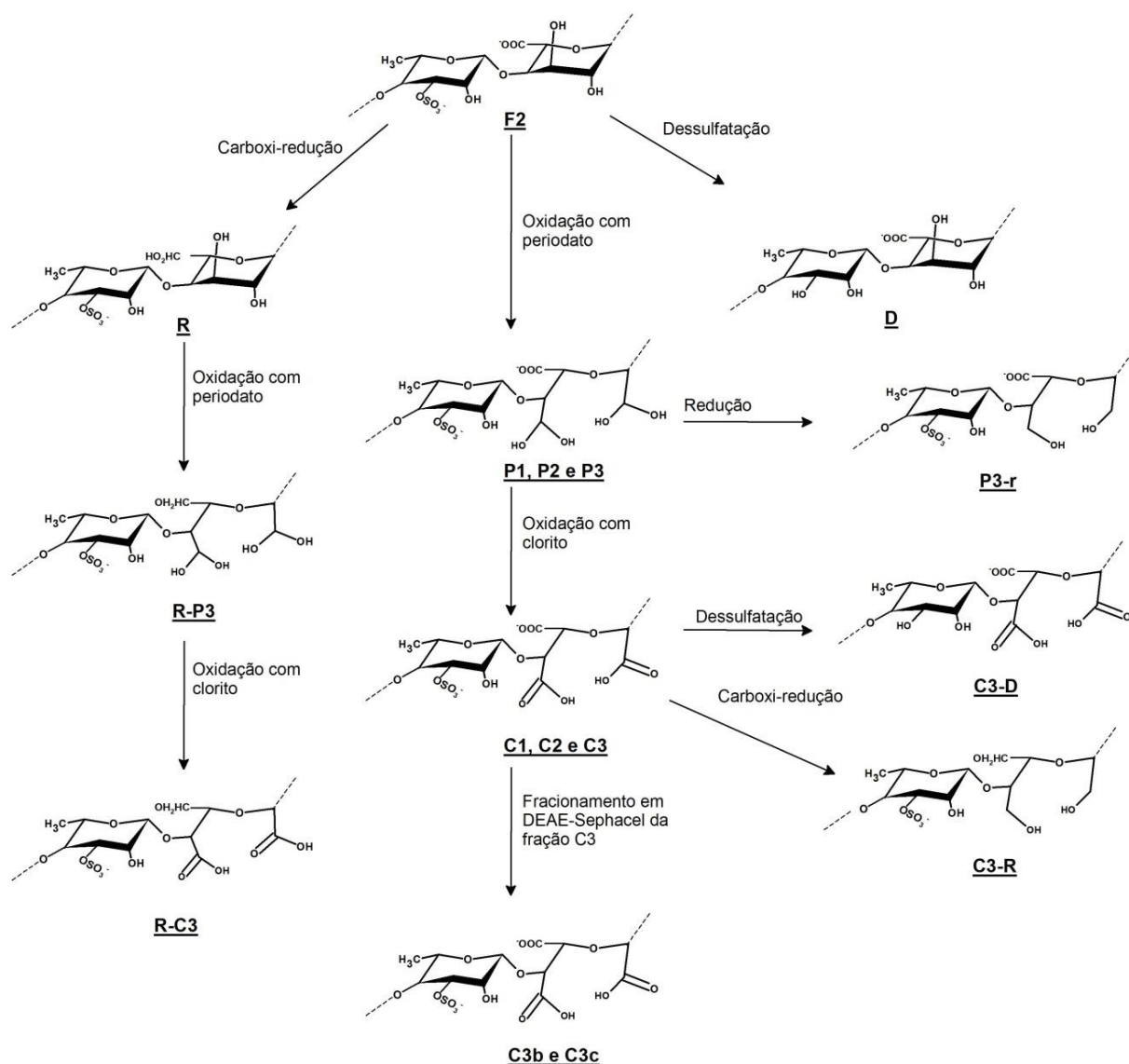
6.11 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS ULVANAS NATIVAS E MODIFICADAS

A atividade anticoagulante das ulvanas nativas presentes em F2 e de seus produtos modificados quimicamente foi realizada através dos ensaios de coagulação APTT (Tempo de tromboplastina parcial ativada), PT (Tempo de protrombina) e TT (Tempo de trombina).

Nestes ensaios, foi observado se as ulvanas nativas e modificadas quimicamente eram capazes de prolongar o tempo necessário para a coagulação sanguínea, em relação ao plasma normal.

As frações utilizadas para estes testes estão representadas na figura 48.

FIGURA 48 - FRAÇÕES UTILIZADAS NOS TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE



NOTA: A figura representa a oxidação das unidades de ácido idurônico da diáide B_{3S} .
 FONTE: O autor (2017)

6.11.1 Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) para as ulvanas nativas (F2) e seus produtos modificados via reações de oxidação, dessulfatação e redução

O teste do APTT foi realizado para as frações F2, R, D, P3, P3-r, C1, C2, C3, C3-D, C3b, C3c e C3c-R. Este ensaio avalia a via intrínseca da cascata de

coagulação através de um substituto plaquetário (cefalina), de um ativador do FXI (cloreto de cálcio) e um fator de contato (caulim ou sílica).

Para a avaliação da atividade anticoagulante foram utilizadas concentrações crescentes das frações citadas acima ($10\text{-}150\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). Como controle positivo (valores normais de coagulação) e negativo de coagulação foram utilizadas a salina e a heparina ($1\text{-}10\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente. Os resultados dos ensaios foram expressos como médias APTT (s) \pm DPM e estão listados na tabela 24. A curva de APTT da heparina está representada na tabela 25.

O ensaio de APTT mostrou que a fração F2 apresenta baixa atividade anticoagulante, a qual é desempenhada a partir de $80\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Após a carboxi-redução dos grupos carboxila dos ácidos glucurônico e idurônico, originando a fração R, esta atividade é ainda menor, mostrando que a presença dos grupos carboxila em C-6 tem efeito positivo sobre a atividade.

É descrito que a presença de grupo carboxila livre é essencial para a atividade anticoagulante da heparina, visto que após a carboxiesterificação destes grupos houve perda da atividade anticoagulante apresentada por este polímero (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986). A oxidação seletiva em C-6 de carragenanas utilizando o reagente TEMPO produziu polímeros com maior atividade anticoagulante. A atividade anticoagulante de carragenanas oxidadas foi atribuída, dentre outros fatores (sulfato, massa molar) aos grupos carboxila, os quais não estavam presentes na carragenana nativa (SANTOS, 2015).

De modo similar à fração R, a ulvana dessulfatada D, obtida após a dessulfatação da fração F2, não apresentou atividade.

A presença de grupos sulfato, bem como seu posicionamento na cadeia polissacarídica é reconhecida como um fator fundamental para a atividade anticoagulante de polissacarídeos (POMIN; MOURÃO, 2008; CIANCIA; QUINTANA; CERESO, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2011).

Para as ulvanas, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a atividade anticoagulante destes polímeros pode ser atribuída a presença simultânea dos grupos sulfato e carboxila.

Nishimura e colaboradores (1986) sulfataram a quitina, polissacarídeo formado por unidades de β -1 \rightarrow 4-N-acetil-D-glucosamina. Os autores observaram que as frações que apresentavam maior atividade anticoagulante foram as com teores similares de carboxila e sulfato. A atividade anticoagulante da quitina sulfatada foi atribuída à inibição da atividade da trombina.

TABELA 24 - TESTE DE APTT DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS

Fração	Polissacarídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	10	20	50	80	100	150
F2	28,4 \pm 0,2	32,2 \pm 0,3	29,5 \pm 0,2	37,3 \pm 0,2	39,5 \pm 0,2	45,6 \pm 0,6
R	28,6 \pm 0,4	28,4 \pm 0,1	28,6 \pm 0,2	30,5 \pm 1,0	30,3 \pm 0,3	30,1 \pm 0,1
D	28,5 \pm 0,1	28,2 \pm 0,2	29,2 \pm 0,4	29,5 \pm 0,1	28,5 \pm 0,3	28,7 \pm 0,5
P3	33,6 \pm 0,3	34,5 \pm 0,1	55,2 \pm 1,9	68,0 \pm 1,3	83,3 \pm 0,8	106,8 \pm 1,1
P3-r	30,4 \pm 0,7	33,8 \pm 0,2	37,3 \pm 0,4	41,6 \pm 0,2	44,1 \pm 0,6	44,9 \pm 0,3
C1	37,1 \pm 1,3	55,0 \pm 0,4	73,1 \pm 1,7	76,7 \pm 3,4	95,4 \pm 1,4	101,0 \pm 1,9
C2	35,0 \pm 1,1	52,7 \pm 0,6	73,5 \pm 1,6	92,3 \pm 0,3	119,9 \pm 0,9	122,2 \pm 1,2
C3	53,1 \pm 1,4	72,1 \pm 4,3	85,2 \pm 0,5	134,5 \pm 3,9	154,5 \pm 4,5	222,0 \pm 7,5
C3-R	29,1 \pm 0,1	29,8 \pm 0,2	31,9 \pm 0,6	36,1 \pm 0,1	46,1 \pm 0,1	56,4 \pm 1,1
C3-D	28,5 \pm 0,8	28,3 \pm 0,2	29,0 \pm 0,5	28,9 \pm 0,8	29,7 \pm 0,6	30,8 \pm 1,1
R-C3	52,8 \pm 1,4	71,5 \pm 3,2	104,7 \pm 5,0	128,3 \pm 2,7	134,8 \pm 5,8	227,0 \pm 3,1
C3b	33,5 \pm 0,1	45,8 \pm 0,3	54,1 \pm 0,3	63,5 \pm 0,7	69,0 \pm 0,7	89,0 \pm 1,4
C3c	37,1 \pm 0,4	66,6 \pm 1,1	76,3 \pm 1,8	120,2 \pm 1,1	147,3 \pm 0,7	210,0 \pm 4,1

Resultados expressos em tempo médio (s) \pm SEM. Salina (29,4 \pm 0,1 s) foi usada como controle positivo de coagulação.

TABELA 25 - TESTE DE APTT PARA A HEPARINA

Fração	Polissacarídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	1	2,5	5	10
Heparina	32,3	34,3	50,8	>300

Resultados expressos em tempo médio (s) \pm SEM. Salina (29,4 \pm 0,1 s) foi usada como controle positivo de coagulação.

A ulvana dialdeídica P3 foi usada como modelo para avaliar o efeito dos grupos aldeído sobre a atividade anticoagulante. Esta ulvana apresentou atividade maior que a ulvana de origem.

P3 diferencia-se de F2 pela presença de grupos aldeído, além de provavelmente apresentar uma cadeia polimérica mais flexível, devido à clivagem do anel em C-2 e C-3.

Com o objetivo de verificar se os grupos aldeído eram responsáveis pela atividade anticoagulante apresentada por esta fração, P3 foi submetida ao tratamento com NaBH_4 originando a fração P3-r. Este procedimento foi realizado com o objetivo de reduzir os grupos aldeído à álcoois primários.

A fração P3-r apresentou menor atividade anticoagulante quando comparado com P3. A atividade anticoagulante de P3 foi atribuída à presença de grupos aldeído, os quais provavelmente devem reagir com os grupos amino das proteínas da cascata de coagulação sanguínea. Considerando que grupos aldeído são altamente reativos, esta interação deve ser inespecífica e irreversível (covalente).

As ulvanas policarboxílicas (C1, C2 e C3) apresentaram um aumento na atividade anticoagulante de maneira dose-dependente na faixa de concentração testada ($10\text{-}150\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). A fração com maior teor de grupos carboxila (C3) apresentou maior APTT (222 s) na maior concentração utilizada ($150\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) quando comparada com as demais ulvanas policarboxílicas.

Quando C3 foi carboxi-reduzida originando a fração C3-R, a atividade anticoagulante diminuiu. Portanto, o aumento da atividade anticoagulante apresentada pelas ulvanas policarboxílicas obtidos no presente trabalho foi atribuído ao aumento no teor de grupos carboxila.

Dentre as frações obtidas após o fracionamento em DEAE-Sephacel, a fração C3c, a qual apresentou maior teor de grupos sulfato e carboxila apresentou maior atividade anticoagulante pelo teste de APTT.

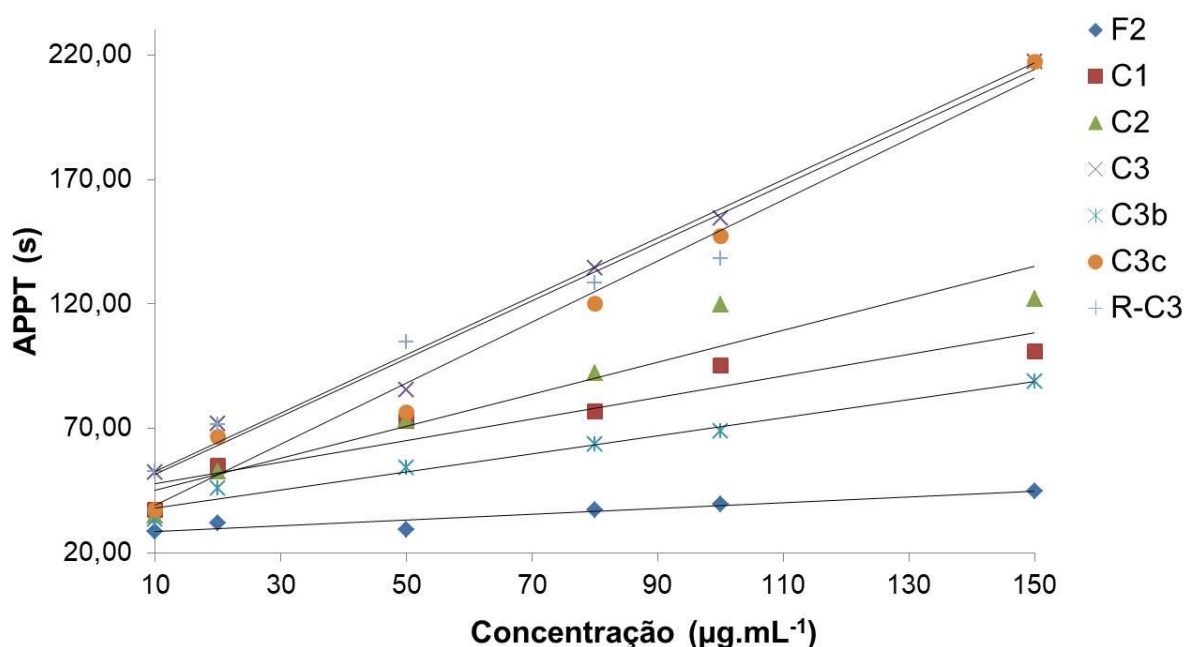
A ulvana R-C3, obtida após a oxidação via periodato-clorito a partir das ulvanas carboxi-reduzidas R também apresentou atividade anticoagulante. O

aumento na atividade indica que a introdução do grupo carboxila em C-2 e C-3 aumenta esta atividade mesmo na ausência do grupo carboxila em C-6.

Visando avaliar o efeito de grupos sulfato na atividade anticoagulante das ulvanas policarboxílicas, a fração C3 foi dessulfatada originando a fração C3-D. A análise da atividade anticoagulante pelo teste de APTT das frações C3 e C3-D mostrou que houve perda da atividade anticoagulante após a remoção dos grupos sulfato, mesmo com a presença de um alto teor de grupos carboxila. Portanto, a presença de grupos sulfato é essencial para a atividade anticoagulante das ulvanas policarboxílicas.

Com o objetivo de comparar a atividade anticoagulante das ulvanas policarboxílicas, foi plotado um gráfico de APTT em função da concentração polissacarídicas com linha de tendência linear para as frações F2, C1, C2, C3, C3b, C3c e R-C3 (Figura 49).

FIGURA 49 - GRÁFICO DO APTT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLÍMERO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS POLICARBOXÍLICOS (C1, C2, C3, C3b, C3c E R-C3)



A partir destas curvas foi calculada uma equação da reta para cada uma das frações, com o objetivo de comparar a atividade anticoagulante entre as amostras.

Estas equações estão representadas na tabela 30. A partir desta equação foi calculada a concentração necessária para que o polissacarídeo dobre o tempo de coagulação em relação à salina (CN2APTT) (Tabela 26). Esse dado representa a potência do fármaco e quanto menor for o valor, maior é a sua potência.

Os resultados mostram que as frações C3, C3c e R-C3 apresentam atividade anticoagulante mais potente quando comparada com as demais frações avaliadas. Dentre estas frações, a fração R-C3, que possui maior teor de carboxilas, apresentou menor CN2APTT.

TABELA 26 - EQUAÇÃO DA RETA, CN2APTT, E $\Delta T \cdot \mu g^{-1}$ DE POLISSACARÍDEO PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS POLICARBOXÍLICOS (C1, C2, C3 C3b, C3c E R-C3)

Fração	Equação da reta	CN2APTT ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	$\Delta T \cdot \mu g^{-1}$ de polissacarídeo (s)
F2	$y = 0,1155x + 27,42$ $R^2 = 0,9022$	271,8	0,12
C1	$y = 0,4218x + 43,54$ $R^2 = 0,8901$	35,4	0,43
C2	$y = 0,642x + 38,73$ $R^2 = 0,9096$	31,3	0,64
C3	$y = 1,1608x + 40,03$ $R^2 = 0,9866$	16,2	1,12
C3b	$y = 0,3627x + 34,35$ $R^2 = 0,9768$	67,4	0,36
C3c	$y = 1,2255x + 27,04$ $R^2 = 0,9792$	26,0	1,26
R-C3	$y = 1,1746x + 40,87$ $R^2 = 0,9633$	15,3	1,17

A partir do coeficiente angular da equação da reta é possível determinar a variação no tempo de APTT (ΔT) que é provocada pela adição de 1 μg de polissacarídeo. Assim como observado para a CN2APTT, as frações que

apresentaram maior atividade foram C3, C3c e R-C3. Dentre estas frações, a fração C3c provocou uma maior variação no tempo de APTT.

6.11.2 Teste de tempo de protrombina (PT) para as ulvanas nativas e policarboxílicas

O teste de PT é usado para avaliar a via extrínseca da cascata de coagulação. Para este ensaio, foram selecionadas as frações F2, C1, C2, C3, C3b e C3c. Como controle positivo (valores normais de coagulação) e negativo de coagulação foram utilizadas a salina e a heparina ($1-20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) respectivamente. Os resultados dos ensaios foram expressos como médias PT (s) \pm DPM e estão listados na tabela 27. A curva de PT para a heparina está representada na tabela 28.

As ulvanas nativas (F2) e os produtos obtidos após a oxidação via periodato-clorito não apresentaram atividade pelo teste de PT.

TABELA 27 - TESTE DE PT PARA A ULVANA NATIVA (F2) E SEUS PRODUTOS POLICARBOXÍLICOS (C1, C2 E C3)

Fração	Polissacarídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	10	50	100	150
F2	$21,0 \pm 1,6$	$19,7 \pm 0,3$	$19,3 \pm 0,1$	$21,8 \pm 1,3$
C1	$21,7 \pm 0,3$	$24,7 \pm 0,3$	$27,1 \pm 0,4$	$28,2 \pm 0,4$
C2	$20,1 \pm 0,5$	$22,8 \pm 0,1$	$26,1 \pm 0,2$	$27,1 \pm 0,2$
C3	$20,3 \pm 0,6$	$23,6 \pm 0,2$	$27,2 \pm 0,2$	$28,5 \pm 0,3$
C3b	$20,0 \pm 0,2$	$27,9 \pm 4,2$	$27,7 \pm 0,5$	$30,0 \pm 0,2$
C3c	$19,8 \pm 0,5$	$25,4 \pm 0,1$	$29,6 \pm 0,5$	$31,1 \pm 0,9$

Resultados expressos em tempo médio (s) \pm SEM. Salina ($19,6 \pm 0,2$ s) foi usada como controle positivo de coagulação.

TABELA 28 - TESTE DE PT PARA A HEPARINA

Fração	Polissacarídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	1	5	10	20
Heparina	18,5	26,0	41,8	100,0

Resultados expressos em tempo médio (s) \pm SEM. Salina ($19,6 \pm 0,2$ s) foi usada como controle positivo de coagulação.

6.11.3 Teste de tempo de trombina (TT) para as ulvanas nativas e policarboxílicas

O teste de tempo de trombina (TT) avalia o tempo necessário para que a trombina converta a fibrina em fibrinogênio. Este é a última etapa da cascata de coagulação sanguínea. Para este ensaio, foram selecionadas as frações F2, C1, C2, C3, C3b e C3c. Como controle positivo (valores normais de coagulação) e negativo de coagulação foram utilizadas a salina e a heparina ($1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) respectivamente. Os resultados dos ensaios foram expressos como médias TT (s) \pm DPM e estão listados na tabela 29. A curva de TT para a heparina está representada na tabela 30.

TABELA 29 - TESTE DE TT DA ULVANA NATIVA (F2) E DE SEUS PRODUTOS POLICARBOXÍLICOS (C1, C2 E C3)

Fração	Polissacarídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	10	50	100	150
F2	$27,2 \pm 0,4$	$35,4 \pm 0,6$	$35,0 \pm 0,6$	$37,1 \pm 0,2$
C1	$31,8 \pm 1,0$	$31,8 \pm 1,0$	$39,2 \pm 1,3$	$43,3 \pm 0,2$
C2	$32,0 \pm 0,8$	$35,3 \pm 0,7$	$40,6 \pm 0,5$	$42,0 \pm 0,8$
C3	$30,0 \pm 1,6$	$34,6 \pm 0,8$	$38,1 \pm 0,6$	$42,2 \pm 0,7$
C3b	$31,8 \pm 1,1$	$35,3 \pm 1,3$	$36,1 \pm 1,1$	$36,2 \pm 0,3$
C3c	$31,1 \pm 0,9$	$34,2 \pm 0,2$	$38,8 \pm 0,9$	$44,0 \pm 2,1$

Resultados expressos em tempo médio (s) \pm SEM. Salina ($30,2 \pm 0,1$ s) foi usada como controle positivo de coagulação.

As ulvanas nativas (F2) e os produtos obtidos após a oxidação via periodato-clorito não apresentaram atividade pelo teste de TT. Portanto, a atividade anticoagulante destes polissacarídeos não envolve ação na trombina.

Considerando que também não houve atividade pelo teste de PT, estes polissacarídeos devem atuar nos fatores da via intrínseca (FXIIa, FXIa, FIXa e FVIIIa) da cascata de coagulação.

TABELA 30 - TESTE DE TT PARA A HEPARINA

Fração	Polissacarídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	1	2,5	5	10
Heparina	30,7	31,9	79,0	100,0

Resultados expressos em tempo médio (s) \pm SEM. Salina ($30,2 \pm 0,1$ s) foi usada como controle positivo de coagulação.

6.12 PROPRIEDADES MACROMOLECULARES DAS ULVANAS NATIVAS E DE SEUS PRODUTOS OBTIDOS VIA OXIDAÇÃO PERIODATO-CLORITO

A oxidação periodato-clorito das ulvanas originou novos biopolímeros com um alto caráter iônico devido à presença natural de grupos sulfato e ao aumento nos teores de grupos carboxila. Estes novos produtos apresentaram uma maior atividade anticoagulante quando comparado com o polímero nativo.

Destaca-se ainda que modificações químicas possam alterar a conformação e as propriedades físico-químicas de polímeros em solução. Desta maneira, as ulvanas nativas e modificadas quimicamente foram avaliadas quanto a sua conformação e distribuição da massa molar pela técnica de HPSEC-RI-LS-VIS. Para tanto, foram utilizadas as ulvanas nativas (F2), dialdeídicas (P1, P2 e P3), dialdeídicas reduzidas (P3-r), policarboxílicas (C1, C2, C3, C3b e C3c) e carboxi-reduzidas policarboxílicas (R-C3).

6.12.1 Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Alto Desempenho (HPSEC) Acoplada a Detector de Índice de Refração (RI) Diferencial, Espalhamento de Luz em ângulo reto (90°) e em ângulo baixo (7°) e detector viscosimétrico (HPSEC-RI-LS-VIS)

A determinação da massa molar das ulvanas nativas e de seus produtos obtidos via oxidação com periodato e periodato-clorito foi realizada através da técnica de cromatografia de exclusão por tamanho acoplada a um detector de índice de refração, de espalhamento de luz a 90 ° e 7° e detector viscosimétrico. O perfil de eluição na coluna de SEC está representado na figura 50.

Os valores de massa molar, dn/dc , dispersão e recuperação em relação ao material injetado na coluna estão representados na tabela 31.

As ulvanas nativas presentes em F2 apresentaram M_w de $123,0 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ e dispersão de 2,5. Foi observado uma diminuição no M_w para P1, P2 e P3 em relação a fração F2, sendo que estes valores foram de 45,0, 41,1 e $37 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, respectivamente. Concomitante com esta diminuição foi observado que nas primeiras 24 horas de reação (P1) há um aumento na dispersão da massa molar ($\bar{D} = 12$). Esta dispersão diminui conforme nos tempos de reação de 48 e 72 horas (frações P2 e P3, respectivamente) para 6,9 e 2,8, respectivamente. Portanto, estes dados mostram que a oxidação com periodato provocou uma diminuição na massa molar das ulvanas. Após a oxidação com clorito houve um aumento no M_w para as ulvanas policarboxílicas C1, C2 e C3. Este aumento foi atribuído à inserção de dois grupos oxigênio para cada uma das unidades oxidadas. Dentre as subfrações de C3, C3c apresentou maior massa molar quando comparado com C3b.

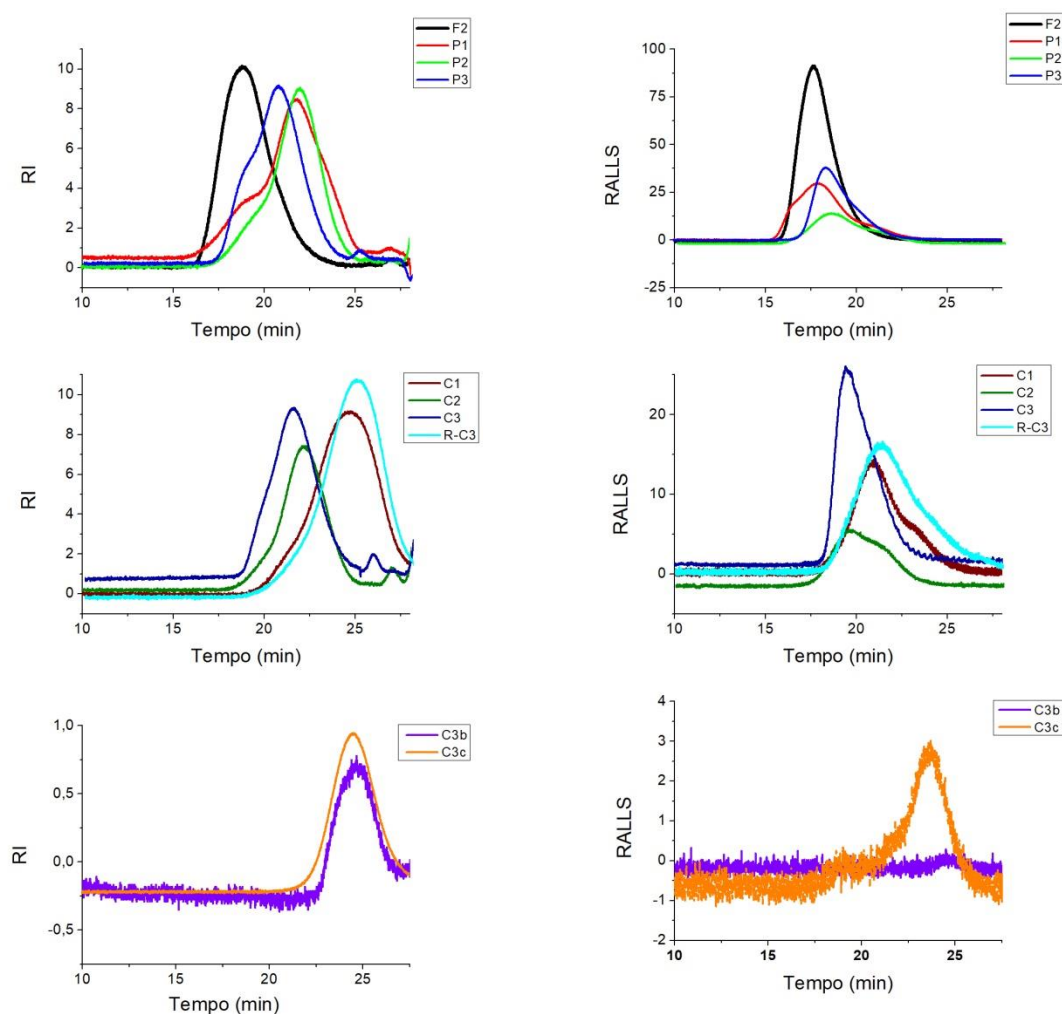
A partir da análise de HPSEC-RI-LS-VIS também foi possível determinar os valores de viscosidade intrínseca, raio de giro, constante α da equação de Mark-Houwink-Sakurada, comprimento de contorno e de persistência. Estes dados estão representados na tabela 32.

A fração F2 apresentou viscosidade intrínseca de $2,5 \text{ dL.g}^{-1}$ e raio de giro de 20 nm. Após a oxidação com periodato houve uma diminuição na viscosidade

intrínseca e no R_g viscosimétrico. A diminuição destes parâmetros foi atribuída à diminuição do M_w .

O valor de α foi 0,208, indicando que este polímero apresenta uma conformação de esfera quando em solução. Robic e colaboradores (2009) também observaram uma conformação de esfera para ulvanas de *U. rotundata*. Para P1, P2 e P3 os valores de α foram 0,508, 0,514 e 0,527, respectivamente. Este dado indica que a oxidação provocou uma mudança na conformação do polímero nativo de esfera homogênea para ao acaso.

FIGURA 50 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO E ESPALHAMENTO DE LUZ DA ULVANA NATIVA F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE



O valor de comprimento de contorno (L) foi calculado utilizando como massa molar da unidade monossacarídica o valor de 207 g.mol^{-1} , o qual foi calculado através de uma média ponderada da massa molar dos monossacarídeos que constituem a fração F2. Para tanto, foi considerando que a fração F2 é composta por 50% de ramnose 3-sulfato ($M = 248 \text{ g.mol}^{-1}$), 25% de xilose ($M = 132 \text{ g.mol}^{-1}$) e 25% de ácidos urônicos ($M = 198 \text{ g.mol}^{-1}$), conforme observado na composição monossacarídica. Com os valores de L e R_g foi possível calcular o comprimento de persistência, L_p (conforme equação descrita no item 2.7.2) da fração F2, o qual foi de 4,1 nm.

O valor de L_p também diminuiu após a oxidação com periodato, indicando que a ruptura da ligação C-C entre C-2 e C-3 após esta modificação química diminuiu a rigidez do polímero em relação à fração F2.

TABELA 31 - MASSA MOLAR MÉDIA PONDERADA, DISPERSÃO, DN/DC E RECUPERAÇÃO DA COLUNA DE HPSEC DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE

Fração	$M_w \times 10^{-3} (\text{g.mol}^{-1})$	\bar{D}	$dn/dc (\text{mL.g}^{-1})$	Recuperação (%)
F2	123,0	2,5	0,139	85,0
P1	45,0	12,0	0,149	72,0
P2	41,1	6,9	0,149	77,0
P3	37,0	2,8	0,149	74,0
P3-r	38,3	4,7	0,129	95,0
C1	46,4	5,6	0,114	100,0
C2	47,3	2,0	0,114	72,0
C3	49,0	2,5	0,114	83,0
C3b	8,1	1,1	0,114	98,2
C3c	17,8	1,6	0,114	100,0
R-C3	42,0	4,3	0,114	98,0

Portanto, estes dados mostram que os produtos obtidos após a oxidação com periodato apresentaram menor massa molar e cadeia polimérica menos rígida quando comparado com a ulvana nativa. A diminuição da massa molar e da rigidez

da cadeia polissacarídica após a oxidação com periodato também já foi descrito para alginatos e quitosanas (VOLD; KRISTIANSEN; CHRISTENSEN, 2006; GOMEZ; RINAUDO; VILLAR, 2007; CHRISTESEN; VOLD; VARUM, 2008).

Dentre os produtos da oxidação com periodato, a fração P3 apresentou maior valor de L_p e maior valor de viscosidade intrínseca quando comparado com P1 e P2, sugerindo que a cadeia polimérica de P3 apresenta maior rigidez quando comparada com os demais produtos da oxidação com periodato. Esta maior rigidez pode ser decorrência da formação de hemiacetais. De acordo com a formação de hemiacetais, a redução dos grupos aldeído (fração P3-r) torna o polímero menos rígido, conforme observado pela diminuição dos valores de L_p e viscosidade intrínseca. Dextranas dialdeídicas obtidas após a oxidação com periodato apresentaram maior viscosidade quando comparada com a dextrana nativa. Este aumento da viscosidade foi atribuído à formação de hemiacetais cíclicos (MAIA *et al.*, 2011).

TABELA 32 - VISCOCIDADE ÍNTRINSECA ($[\eta]$), RÁDIO DE GIRO (R_g), α , COMPRIMENTO DE CONTORNO (L) E DE PERSISTÊNCIA (L_p) DA FRAÇÃO F2 E DE SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE

Fração	$[\eta]$ (dL.g ⁻¹)	R_g (nm) ^a	α	L (nm)	L_p (nm)
F2	2,5	20	0,208	309,5	4,1
P1	0,62	7,6	0,508	113,0	1,6
P2	0,62	7,3	0,514	103,3	1,6
P3	0,71	8,7	0,527	60,3	2,6
P3-r	0,52	7,7	0,524	96	1,9
C1	0,59	7,8	0,595	112,2	1,7
C2	0,43	8,1	0,559	114,3	1,6
C3	0,59	9,1	0,502	118,5	2,2
C3c	0,31	5,5	0,810	43,1	2,5
R-C3	0,40	6,7	0,565	101,6	1,4

^a Raio de giro viscosimétrico, obtido a partir da equação de Flory-Fox.

Também foi observado diminuição na viscosidade e aumento no R_g viscosimétrico. Os valores de α dos produtos obtidos após a oxidação com clorito foram de 0,502-0,595, indicando que estes produtos apresentam uma conformação aleatória.

O valor de L foi calculado utilizando como massa molar da unidade monossacarídica o valor de 215 g.mol^{-1} , o qual foi calculado através de uma média ponderada da massa molar dos monossacarídeos que constituem estas frações. Para tanto, foi considerando que estas frações são compostas por 50% de ramnose 3-sulfato ($M = 248 \text{ g.mol}^{-1}$), 25% de xilose 2,3-dicarboxílica ($M = 164 \text{ g.mol}^{-1}$) e 25% de ácidos urônicos ($M = 198 \text{ g.mol}^{-1}$). A partir dos valores de L e R_g foi possível calcular o L_p .

Para as frações C1, C2 e C3 foi observado um aumento nos valores de L_p em relação às suas respectivas frações de origem, indicando que a inserção de grupos carboxila aumentou a rigidez polimérica.

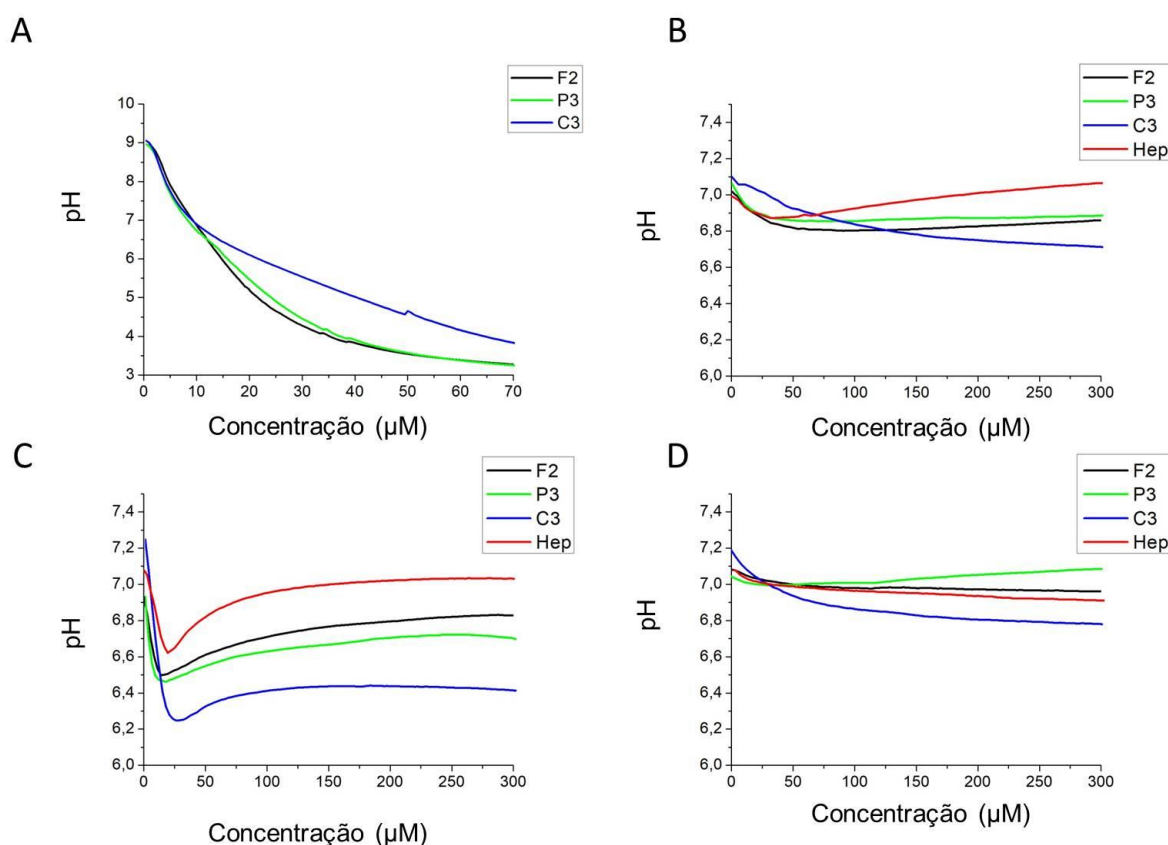
Para a fração C3b não foi possível calcular os valores de viscosidade e de raio de giro. A fração C3c apresentou uma conformação mais rígida em relação à fração de origem, conforme observado pelos valores de L_p e α . Esta maior rigidez foi atribuída ao maior teor de grupos carboxila e sulfato desta fração quando comparado com C3, uma vez que a repulsão provocada pela presença de grupos iônicos de mesma carga faz com que a cadeia se torne mais estendida.

6.13 TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS

Foram submetidas às titulações potenciométricas as frações F2, P3 e C3. A titulação com HCl foi realizada com o objetivo de determinar o pK_a dos grupos ionizáveis presentes nestas amostras. Estas frações também foram submetidas às titulações com soluções de NaCl e CaCl_2 , com o objetivo de verificar a afinidade das ulvanas nativas e de seus produtos modificados com os íons Na^+ e Ca^{2+} , respectivamente. Estes íons foram selecionados por estarem presentes nos reativos utilizados nos testes de atividade anticoagulante.

As curvas de titulação das ulvanas nativas, dialdeídicas e policarboxílicas utilizando HCl, NaCl e CaCl_2 estão representadas na figura 51 e os resultados estão discutidos adiante.

FIGURA 51 - CURVA DE TITULAÇÃO DA ULVANA NATIVA F2, DIALDEÍDICA P3 E POLICARBOXÍLICA C3 COM HCl (A), NaCl (B) E CaCl_2 (C e D)



6.13.1 Titulação das ulvanas nativas e policarboxílicas com HCl

Para a titulação com HCl, as frações F2, P3 e C3 foram dissolvidas em água ultrapura na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e então tituladas com uma solução de HCl $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ até que o pH final da titulação atingisse o valor de 3,0. A variação do pH em função da concentração de HCl para as frações F2, P3 e C3 está representada na figura 51A.

Os pontos de inflexão das curvas foram determinados utilizando o freeware Curtipot versão 4.2 (GUTZ, 1992-2017). A relação dos pKa's dos grupos ionizáveis presentes nas frações F2, P3 e C3 estão representadas na tabela 33. As frações F2 e P3 apresentaram 8 e 7 grupos ionizáveis, respectivamente, com pKa's entre 4,0-8,4. Já a fração C3 apresentou 4 grupos ionizáveis cujos pKa's foram: 8,5, 6,5, 6,0 e 4,6.

TABELA 33 - VALORES DE pKa DOS GRUPOS IONIZÁVEIS PRESENTES NAS FRAÇÕES F2, P3 E C3

Fração		
F2	P3	C3
8,4	8,2	8,5
6,5	6,2	6,5
6,0	5,7	6,0
5,4	-	-
5,0	5,0	-
4,5	4,5	4,6
4,2	4,3	-
4,0	4,2	-

De acordo com a estrutura química da ulvana, estes polissacarídeos apresentam dois tipos de grupos ionizáveis: carboxila e sulfato. No entanto, destaca-se que os valores dos pKa's dos grupos ionizáveis pode variar de acordo com o caráter mais ou menos polar do microambiente no qual estes grupos se encontram.

Para as ulvanas nativas e policarboxílicas é possível que os pKa's dos grupos ionizáveis sejam influenciados por regiões hidrofóbicas, as quais podem ocorrer devido à presença da ramnose. Polieletrólitos hidrofóbicos apresentam um comportamento complexo em relação ao pKa, uma vez que a hidrofobicidade induz uma atração entre os monômeros a qual compete com a força de repulsão dos grupos iônicos (URRY *et al.*, 1994; ISOM *et al.*, 2011).

A variação do pKa dos grupos ionizáveis de uma molécula em função do ambiente químico é descrita para os resíduos de aminoácidos das proteínas.

Urry e colaboradores (1994) estudaram a variação do pKa do grupo carboxila do ácido aspártico de acordo com o caráter menos ou mais polar dos aminoácidos presentes na vizinhança para uma proteína análoga a elastina. Quando próximo do aminoácido valina, o pKa do grupo carboxila foi de 3,9. Quando a valina foi substituída pela fenilalanina nas posições mais distantes em relação ao ácido aspártico, o pKa do grupo carboxila foi 6,7. Adicionalmente, quando a valina foi

substituída pela fenilalanina em posições mais próximas possíveis do ácido aspártico, mas que ainda mantivesse a mesma estrutura terciária, o pKa do grupo carboxila foi 10,4. A fenilalanina apresenta uma cadeia lateral menos polar que a valina e, portanto, a presença deste aminoácido pode deslocar o pKa da carboxila para valores maiores em relação aos valores de pKa destes grupos quando em contato com a água.

Para o grupo amina do aminoácido lisina também foi observada uma grande variação do pKa de quando este se encontra na superfície da proteína (SNase, uma nucleasse presente em *Staphylococcus aureus*) e de quando este está em regiões hidrofóbicas. Para este resíduo em regiões mais hidrofóbicas foi observada uma diminuição de até 5 unidades em relação ao valor de pKa deste grupo quando em contato com a água (ISOM *et al.*, 2011).

6.13.2 Titulação das ulvanas nativas e policarboxílicas com NaCl

A titulação com NaCl foi realizada para verificar a afinidade das ulvanas nativas e de seus produtos modificados com o íon Na^+ .

As frações F2, P3 e C3 foram dissolvidas em água ultrapura na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Então, estas frações foram tituladas com uma solução de NaCl 0,9% até que a concentração final do titulante fosse $300 \mu\text{M}$. As curvas de titulação destas frações foram comparadas com a curva de titulação da heparina.

Os gráficos foram representados como a variação do pH em função da concentração de NaCl. As curvas de titulação com NaCl das frações F2, P3, C3 e da heparina estão representadas na figura 51B.

A partir da titulação com NaCl foi observada uma diminuição no valor de pH para todas as frações e para a heparina, indicando que há troca de H^+ presente nestas frações com o Na^+ da solução. Portanto, este dado sugere que tanto as ulvanas nativas e modificadas quimicamente, quanto a heparina, apresentam afinidade com o Na^+ . A fração C3 apresentou maior afinidade, o que está de acordo com o maior caráter iônico desta fração. A origem do H^+ foi atribuída ao

deslocamento do pKa dos grupos carboxila em regiões menos acessíveis ao solvente.

6.13.3 Titulação das ulvanas nativas e policarboxílicas com CaCl_2

A titulação com CaCl_2 foi realizada para verificar a afinidade das ulvanas nativas e de seus produtos modificados com o íon Ca^{2+} .

As frações F2, P3 e C3 foram dissolvidas em água ultrapura na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Então, estas frações foram tituladas com uma solução de CaCl_2 0,9% até que a concentração final do titulante fosse $300 \mu\text{M}$. As curvas de titulação destas frações foram comparadas com a curva de titulação da heparina.

Os gráficos foram representados como a variação do pH em função da concentração de CaCl_2 . As curvas de titulação com CaCl_2 das frações F2, P3, C3 e da heparina estão representadas na figura 51C.

A partir da titulação com CaCl_2 foi observada uma diminuição no valor de pH para todas as frações e para a heparina, indicando que há troca de H^+ presente nestas frações com o Ca^{2+} da solução. Portanto, este dado sugere que tanto as ulvanas nativas e modificadas quimicamente, quanto a heparina, apresentam afinidade com o íon Ca^{2+} . A fração C3 apresentou maior afinidade, o que está de acordo com o maior caráter iônico desta fração. A origem do H^+ foi atribuída ao deslocamento do pKa dos grupos carboxila presente em regiões menos acessíveis ao solvente. A concentração de CaCl_2 necessária para saturar os sítios de ligação ao cálcio presentes no polissacarídeo foi de 14, 16,8, 30,7 e $19,6 \mu\text{M}$ para F2, P3, C3 e heparina, respectivamente.

A afinidade da heparina pelo cálcio está de acordo com a literatura. Muitas das interações heparina-proteína envolvem estabilização com o íon cálcio, como por exemplo, a interação com a antitrombina e a anexina V (CASU *et al.*, 1984). Estudos de RMN demonstraram que os principais sítios de complexação da heparina com o cálcio são: o grupo carboxila do α -L-ácido idurônico, grupos sulfato em C-2 e o grupo amino sulfatado (AYOTTE; PERLIN, 1986; RABENSTEIN; ROBERT; PENG, 1995).

A afinidade da heparina com o cálcio já foi estudada através da técnica de titulação potenciométrica por Grant, Long e Williamson (1992). Os autores também observaram uma diminuição no valor de pH de acordo com a adição de CaCl_2 em pH 6.5. Neste trabalho, os autores sugerem que a origem do H^+ pode estar relacionada com a alteração do pKa de grupos carboxilas presentes em regiões mais impedidas da molécula.

6.13.4 Titulação das ulvanas nativas e policarboxílicas com CaCl_2 na presença de NaCl 0,9%

Esta titulação foi realizada com o objetivo de verificar se as ulvanas nativas e de seus produtos modificados possuem afinidade com o íon Ca^{2+} mesmo na presença de excesso de íon Na^+ .

As frações F2, P3 e C3 foram dissolvidas em uma solução de NaCl 0,9% na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Estas frações foram tituladas com uma solução de CaCl_2 0,9% até que o volume final do titulante fosse 300 μM . As curvas de titulação destas frações foram comparadas com a curva de titulação da heparina.

Os gráficos foram representados como a variação do pH em função da concentração de CaCl_2 . As curvas de titulação com CaCl_2 das frações F2, P3 e C3 estão representadas na figura 51D.

Estes dados mostraram que na presença de NaCl, a interação das frações F2, P3 e C3 e da heparina com o Ca^{2+} diminui. Portanto, estes resultados demonstram que há uma competição entre os íons Na^+ e Ca^{2+} na interação com estes polissacarídeos.

6.14 ANÁLISES DE RMN DAS ULVANAS NATIVAS E POLICARBOXÍLICAS PRESENÇA DE CÁLCIO

Os testes de titulação potenciométrica com CaCl_2 mostraram que a ulvana policarboxílica (Fração C3) apresentou maior afinidade com o cálcio em comparação com a ulvana nativa (fração F2).

O aumento da afinidade por íons Ca^{2+} também já foi observado para os produtos obtidos após a oxidação com periodato-clorito da amilose, amilopectina, celulose e dextranas (CASU *et al.*, 1984; FLOOR *et al.*, 1990). A maior afinidade com o cálcio apresentada pelos produtos dicarboxílicos pode estar relacionado com o maior teor de grupos carboxila.

A identificação dos grupos funcionais responsáveis pela interação de moléculas com íons metálicos pode ser avaliada através das diferenças nos deslocamentos químicos dos espectros de RMN em função da presença ou ausência deste íon (MAZÁK *et al.*, 2014). Portanto, no presente trabalho, foram comparados os espectros das frações F2 e C3 na presença e na ausência de Ca^{2+} .

6.14.1 Análises de RMN das frações F2-Dw e F2-DwCa

A fração F2 foi tratada com resina DOWEX originando a fração F2-Dw. Parte da fração F2-Dw foi tratada com CaCl_2 , originando a fração F2-DwCa. Ambas as frações foram analisadas por RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC (Figuras 52-54). O pH das amostras para estas análises foi entre 2-3.

A comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C de F2-Dw e F2-DwCa mostrou que a presença do íons Ca^{2+} provoca um deslocamento no sinal do C-6 da carboxila dos ácidos urônicos de 173,1 para 173,3 ppm (Figura 52).

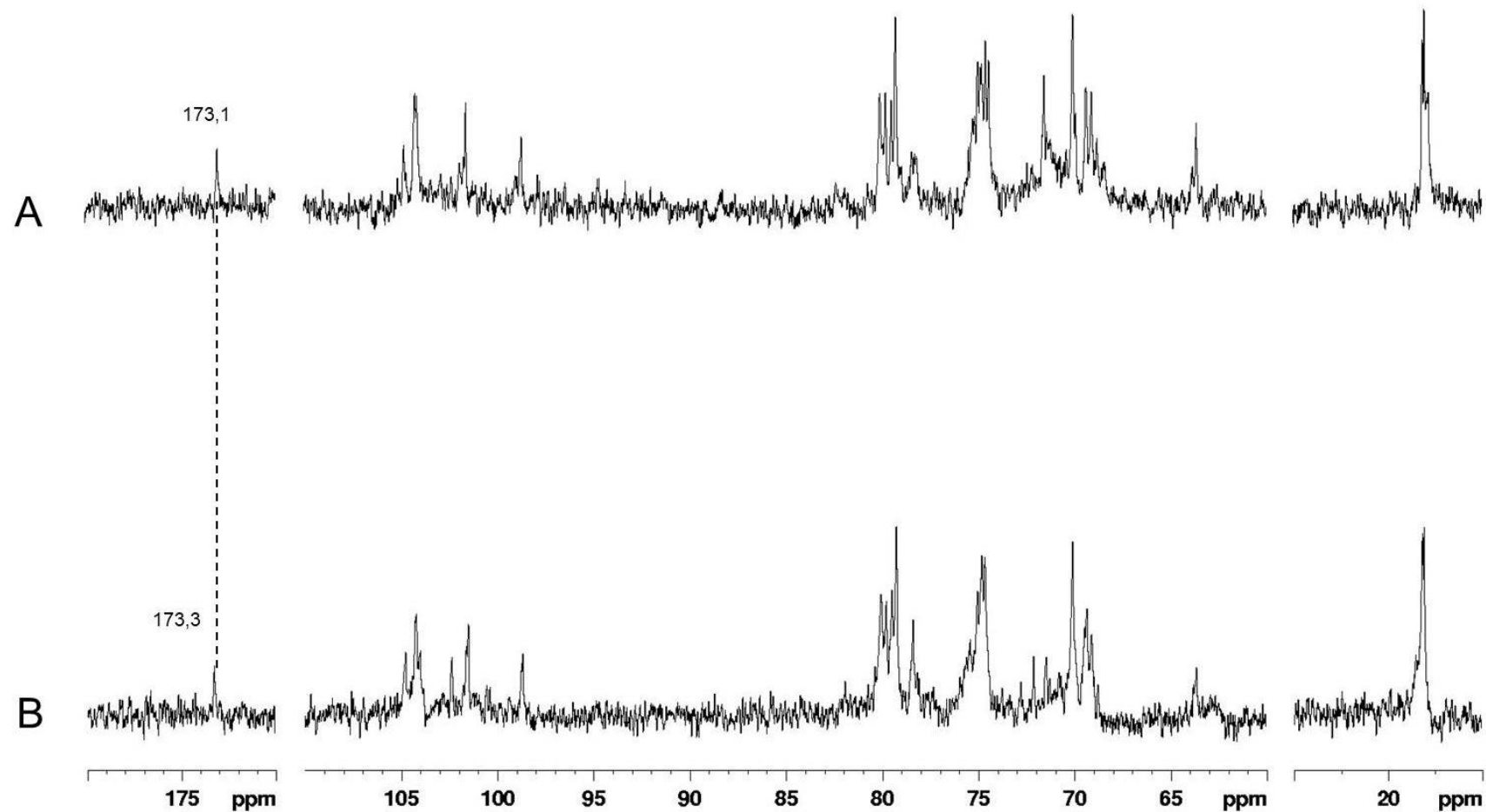
No espectro de HSQC (Figura 53) de F2-Dw, o C-5/H-5 das unidades de β -D-ácido glucurônico e α -L-idurônico foram assinalados em 74,4/4,14 e 70,8/4,90 ppm, respectivamente. Na presença de cálcio, a correlação do C-5/H-5 dos β -D-ácidos glucurônico e α -L-idurônico foram assinalados em 74,7/4,07 e ppm. e 71,1/4,86 ppm.

Portanto, foi observado um deslocamento químico no RMN de ^1H de -0,07 ppm e -0,04 ppm para dos β -D-ácidos glucurônico e α -L-idurônico, respectivamente. No espectro de ^{13}C , este deslocamento foi +0,3 ppm para ambos os ácidos urônicos. A mudança nas correlações do C-5/H-5 dos ácidos urônicos sugere a interação dos íons cálcio com a carboxila dessas unidades.

Não foi observada diferença entre as frações quanto à correlação referentes ao C-3/H-3 da ramnose 3-sulfato, indicando que nas condições realizadas para este experimento não há interação do cálcio com esses grupos.

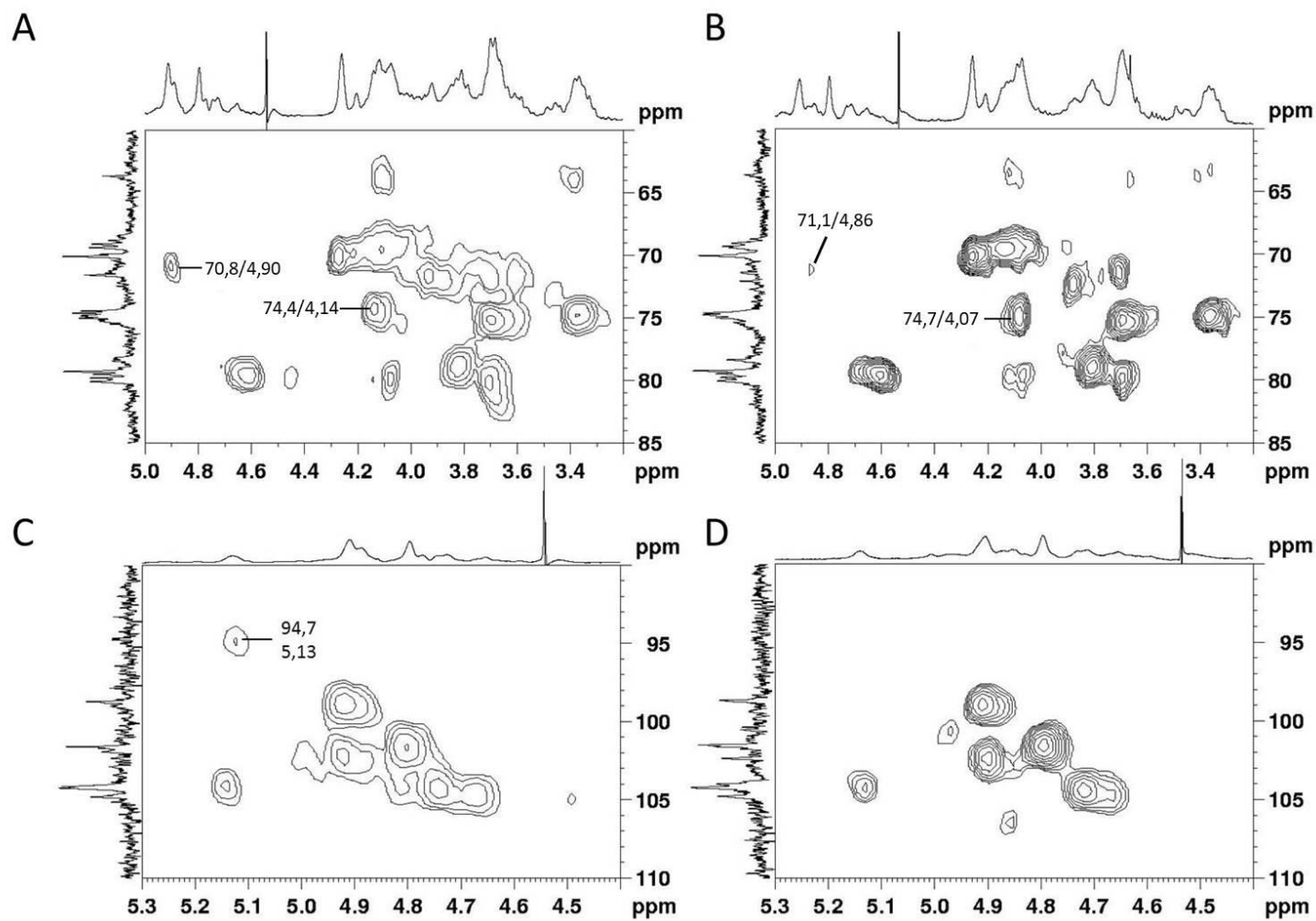
Mazák e colaboradores (2014) observaram nos espectros de RMN de ^{13}C da enoxaparina e do fondaparinux o deslocamento químico do C-5 na ausência e na presença de cálcio em diferentes pH. Em pH 4,0 e na presença de Ca^{2+} , o C-5 destas unidades apresentou um deslocamento +0,4 ppm em relação ao sinal observado na ausência deste íon. Este dado sugere que os grupos carboxila das unidades de ácidos urônicos destes polímeros representam um sítio de interação com o cálcio.

FIGURA 52 - RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES F2-Dw (A) E F2-DwCa (B)



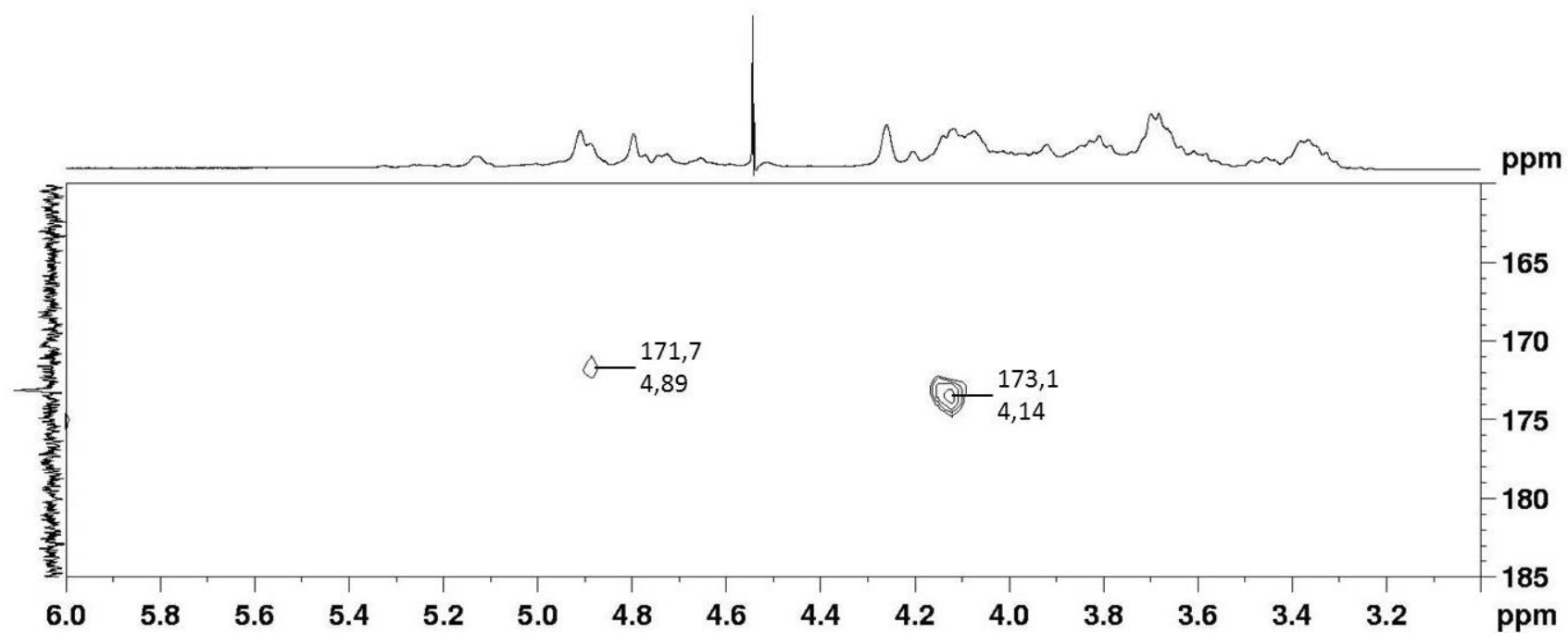
Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 50 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 53 - RMN DE HSQC DAS FRAÇÕES F2-Dw (A e C) E F2-DwCa (B e D)



NOTA: Solvente = D_2O . Temperatura = 50 °C. Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm).

FIGURA 54 - RMN DE HMBC DA FRAÇÃO F2-DW



NOTA: Solvente = D_2O . Temperatura = 50 °C. Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm).

Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 50 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

6.14.2 Análises de RMN das frações C3-Dw e C3-DwCa

A fração C3 foi tratada com resina DOWEX originando a fração C3-Dw. Parte da fração C3-Dw foi tratada com CaCl_2 , originando a fração C3-DwCa. Ambas as frações foram analisadas por RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC (Figuras 55 e 56). O pH das amostras para estas análises foi entre 2-3.

Na região anomérica do espectro de HSQC das frações C3-Dw e C3-DwCa foram observadas as correlações anoméricas referentes às díades A_{3S} : $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-3S-(1}\rightarrow]$ (104,3/4,72 e 101,7/4,81 ppm) e $U_{2'3S}$: $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xyl2S-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-3S-(1}\rightarrow]$ (99,9/4,94 e 100,2/4,97 ppm).

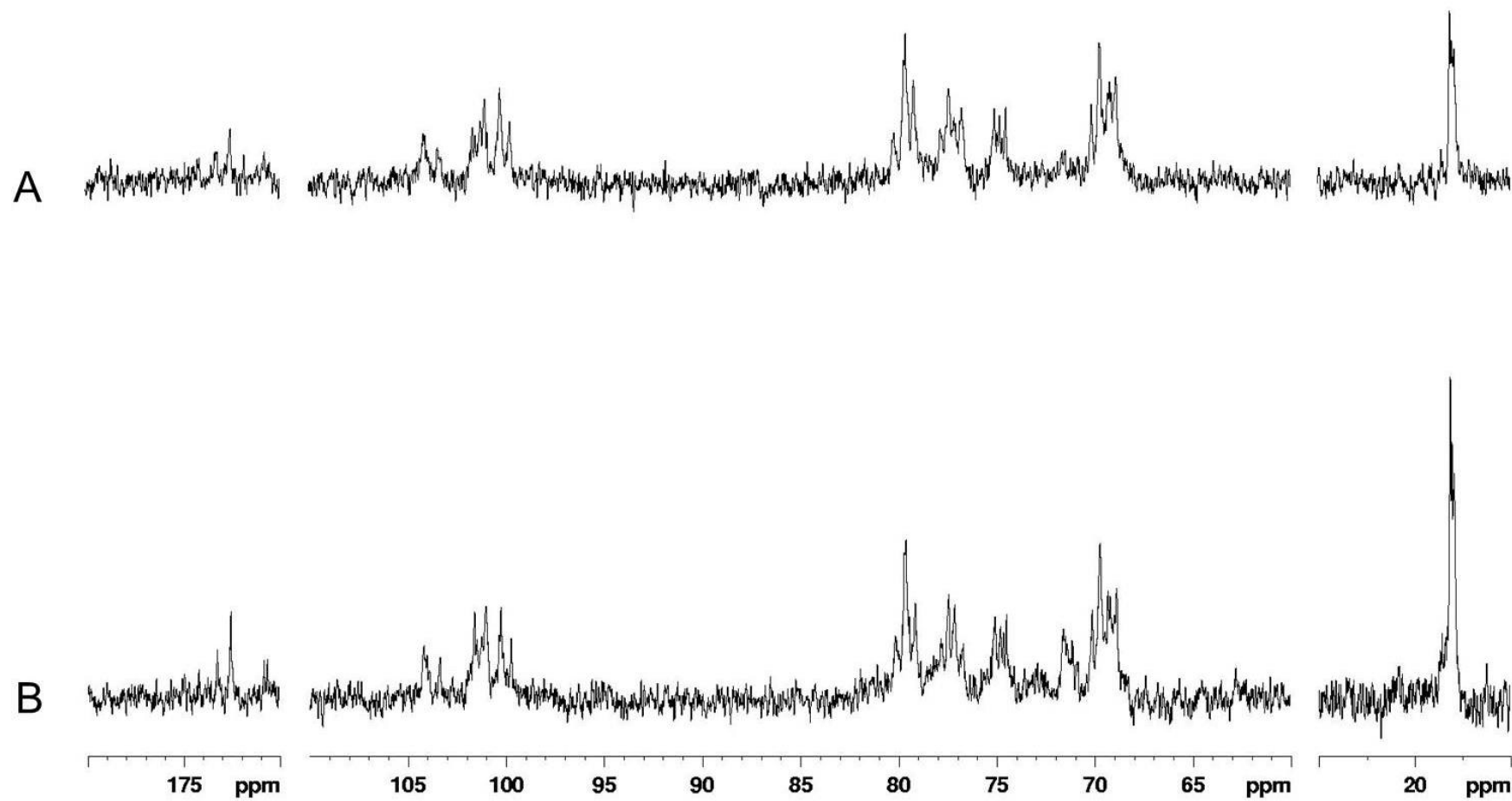
Também foram identificadas no espectro de HSQC da fração C3-Dw as correlações em 99,7/5,38; 100,3/5,33 e 103,1/4,85 ppm. Estas correlações foram atribuídas ao C-1/H-1 das unidades oxidadas. Na presença de Ca^{2+} (fração C3-DwCa), estas correlações foram assinaladas em: 99,6/5,36, 100,6/5,30 e 103,2/4,84 ppm. Portanto, estes sinais apresentaram um deslocamento máximo de + 0,2 e + 0,03 ppm nos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H , respectivamente.

Na região de 85-60/5,2-3,0 ppm do espectro de HSQC da fração C3-Dw foram identificadas as correlações em 79,3/5,03; 77,5/4,91; 79,2/4,86 e 77,5/4,77. Estas correlações foram atribuídas ao C-4/H-4 das unidades oxidadas. Para a fração C3-DwCa), estas correlações foram assinaladas em: 79,7/5,00; 77,5/4,89; 79,2/4,84 e 77,5/4,75 ppm. Portanto, estes sinais apresentaram um deslocamento máximo de + 0,4 e + 0,02 ppm nos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H , respectivamente.

As correlações do C-5/H-5 do ácido glucurônico foram assinaladas em 74,5/4,11-4,13 e 74,5/4,09-4,12 ppm, respectivamente.

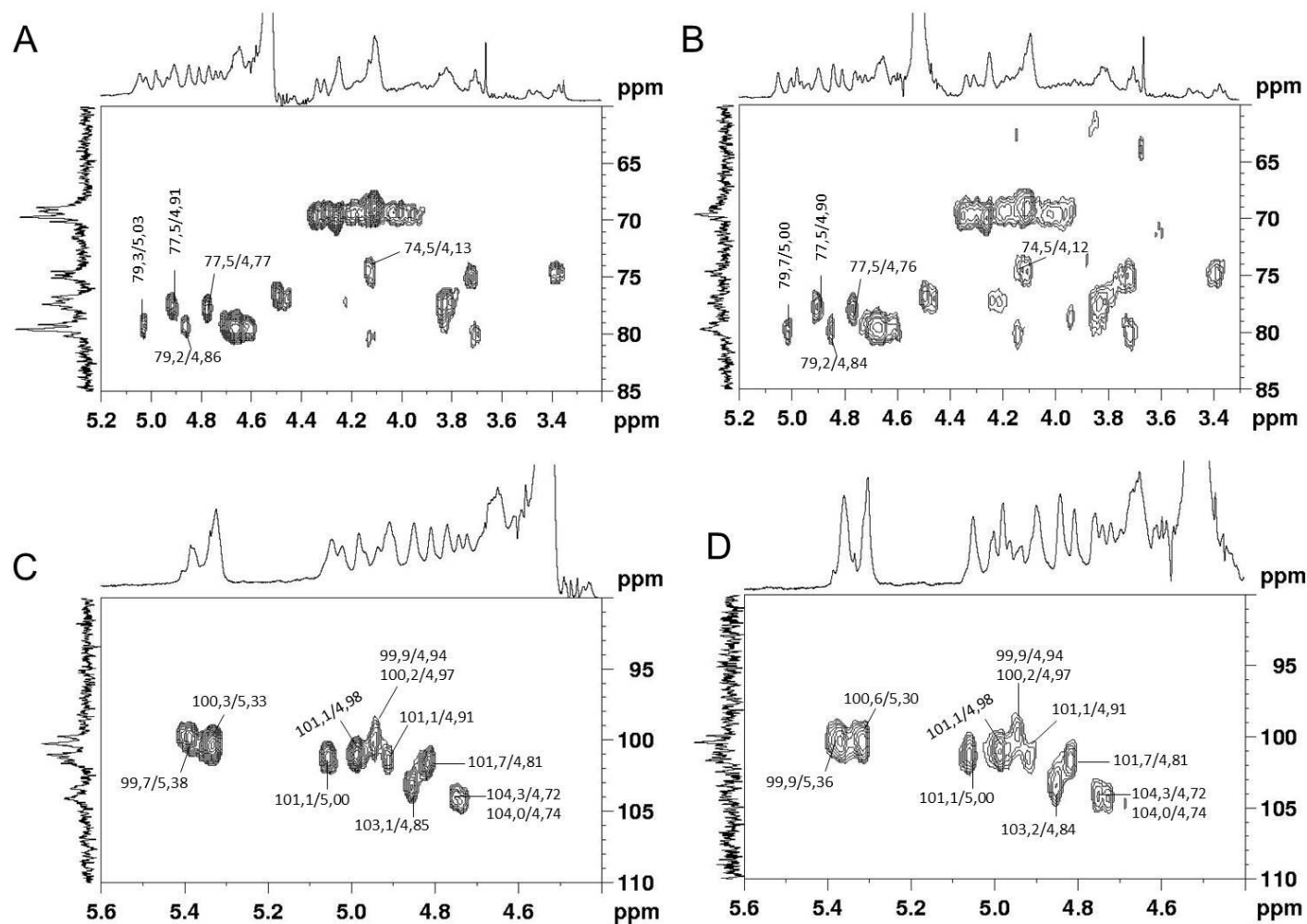
Portanto, os deslocamentos das correlações do C-1/H-2, C-4/H-4 e C-5/H-5 em função da presença de cálcio sugere que os grupos carboxila em C-2, C-3 e C-6 são um sítio de interação para o cálcio nas ulvanas policarboxílicas.

FIGURA 55 - RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C3-Dw (A) E C3-DwCa (B)



Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 50 °C. Calibrado com acetona em 31,45 ppm.

FIGURA 56 - RMN DE HSQC DAS FRAÇÕES C3-Dw (A e C) E C3-DwCa (B e D)



NOTA: Solvente = D₂O. Temperatura = 50 °C. Acetona como padrão interno para ¹H (2,225 ppm) e ¹³C(31,45 ppm).

6.15 RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA DAS ULVANAS NATIVAS E POLICARBOXÍLICAS E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

A atividade anticoagulante de polissacarídeos depende de fatores estruturais como presença de grupos sulfato, posicionamento específico destes grupos, além da massa molar (POMIN; MOURÃO, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2013). A presença de grupos carboxila livre também tem sido correlacionada com a atividade anticoagulante da heparina (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986). Ainda, a inserção de carboxila em C-6 de carragenanas aumentou a atividade anticoagulante apresentada por estes polímeros (SANTOS, 2015).

No presente trabalho foram obtidas ulvanas policarboxílicas (C1, C2, C3 e R-C3) a partir da oxidação via periodato-clorito dos polissacarídeos de *U. fasciata*. Estes derivados apresentaram maior atividade anticoagulante quando comparado com o polímero original.

Em relação às características estruturais, as ulvanas policarboxílicas apresentaram valores de massa molar e teores de grupos sulfato similares (M_w de $42-49 \times 10^3$ mmol.g⁻¹ e sulfato de 19,7-22,7%). As frações C1, C2 e C3 apresentam grupos carboxila em C-2 e C-3 das unidades de xilose e ácido idurônico e em C-6 do ácido glucurônico e idurônico. A fração R-C3 diferencia-se das demais por não apresentar grupos carboxila em C-6.

A correlação do CN2APTT (concentração necessária para dobrar o tempo de APTT em relação à salina) com os teores de grupos sulfato e de carboxila está representada no gráfico da figura 57.

É possível observar que há um aumento na potencia da atividade anticoagulante pelo teste de APTT na seguinte ordem: C1, C2, C3 e R-C3. Portanto, para frações de ulvanas policarboxílicas com a mesma massa molar e mesmo teor de grupos sulfato, o aumento no teor de grupos carboxila tem efeito positivo na potência da atividade anticoagulante.

Destaca-se que para as ulvanas policarboxílicas, a presença do grupo carboxila em C-6 não foi determinante para a CN2APTT destes polímeros. Diferentemente, os grupos carboxila dos ácidos urônicos nas ulvanas nativas foram

essenciais para atividade anticoagulante. Desta maneira, a atividade anticoagulante das ulvanas nativas e policarboxílicas dependem da densidade de grupos carboxila.

A fração C3 foi fracionada em DEAE-Sephacel tendo sido obtida a fração C3c a qual apresentou menor massa molar ($M_w = 17,8 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$) e maiores teores de sulfato e carboxila (25% e $2,10 \times 10^3 \text{ mmol.g}^{-1}$, respectivamente), quando comparada com as demais ulvanas policarboxílicas.

C3c também apresentou pronunciada atividade anticoagulante. No entanto, esta potência foi menor quando comparada com as frações de maior atividade (C3 e R-C3), mesmo esta fração apresentando maior teor de grupos sulfato e carboxila.

A massa molar dos polissacarídeos também é um dos parâmetros que influenciam na atividade anticoagulante destes polímeros. Este fator foi correlacionado com a menor potência apresentada por C3c.

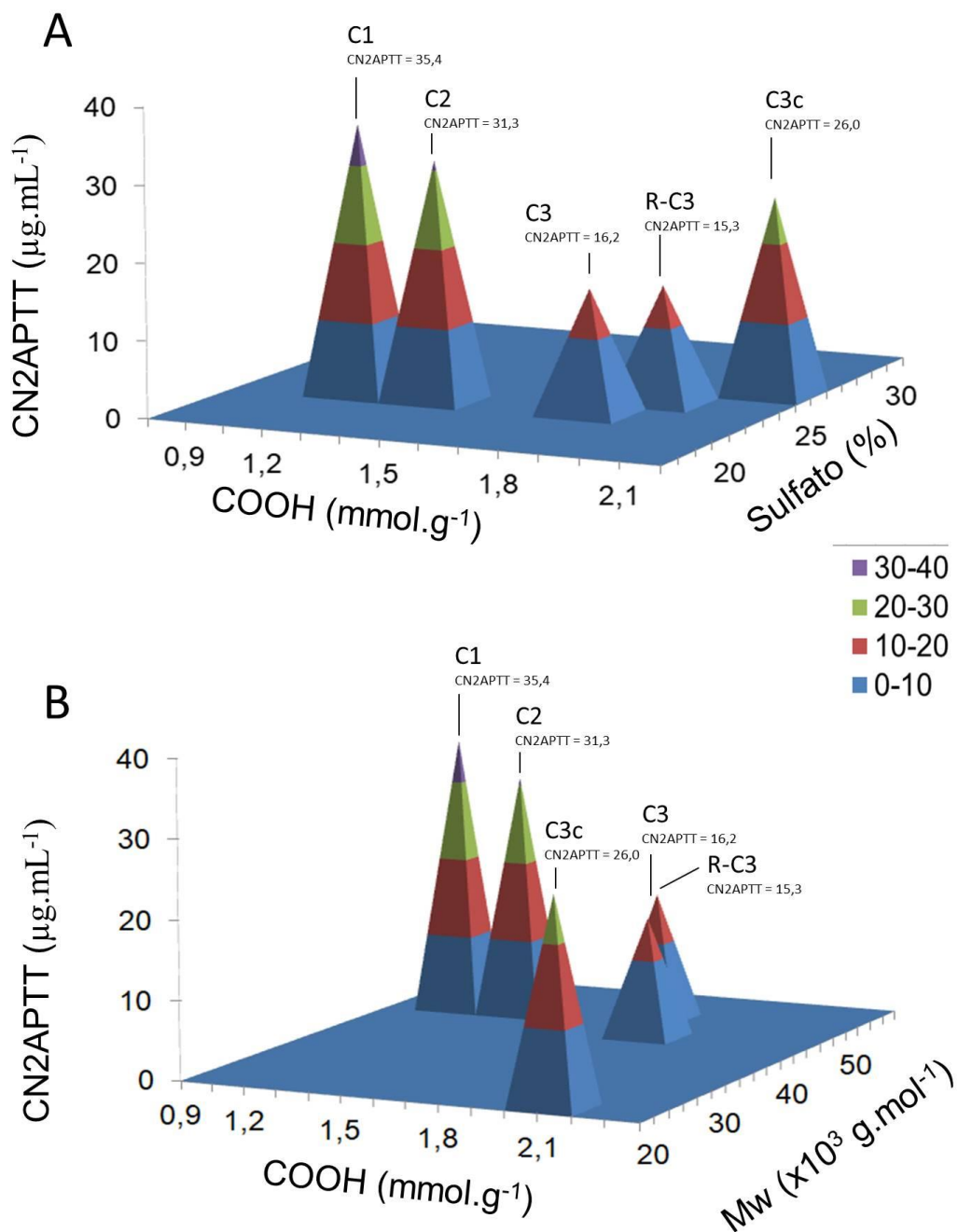
Outro fator que tem sido correlacionado com a atividade anticoagulante é a flexibilidade da cadeia polissacarídica. Esta atividade é favorecida para polímeros que apresentem cadeia ao acaso em solução e que sejam capazes de adquirir uma conformação ordenada para a formação do complexo entre o polissacarídeo e a proteína alvo (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010). Dentro deste contexto, C3c apresentou menor flexibilidade quando comparado com os demais polímeros, conforme observado pelos valores de α e L_p (Tabela 32)

Sendo assim, a atividade anticoagulante de polissacarídeos depende de um balanço de cargas negativas no qual o polímero adote uma cadeia de conformação aleatória em solução.

Para as ulvanas policarboxílicas foi possível determinar que os parâmetros importantes para a atividade anticoagulante destes polímeros são: 1- Presença de grupos sulfato; 2- Densidade de grupos carboxila; 3- Massa molar e 4- Conformação aleatória.

Portanto, as ulvanas policarboxílicas obtidas no presente trabalho são estruturas inéditas e com potencial aplicação na terapia anticoagulante.

FIGURA 57- VALORES DE CN2APTT DAS ULVANAS POLICARBOXÍLICAS EM FUNÇÃO DO TEOR DE SULFATO, CARBOXILA E M_w



NOTA: A = Correlação entre CN2APTT, carboxila e sulfato. B = Correlação entre CN2APTT, carboxila e M_w .

Estes polímeros foram obtidos utilizando como matéria-prima as ulvanas bio-sintetizadas pela macroalga verde *U. fasciata*. Estas macroalgas representam

uma fonte renovável de ulvanas e são passíveis de cultivo, o que torna viável a produção destes polissacarídeos em larga escala.

As ulvanas policarboxílicas apresentaram uma redução no M_w de 2,5 - 2,9 vezes em relação ao polímero original. Destaca-se que a obtenção de moléculas bioativas de baixa massa molar é importante na projeção de novos fármacos com atividade anticoagulante.

CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram obtidas ulvanas policarboxílicas contendo unidades 2,3-dicarboxil-xilose, 2,3,6-tricarboxil-ácido idurônico e 2,3,6-tricarboxil-ácido glucurônico a partir da oxidação via periodato-clorito de ulvanas de *Ulva fasciata* (Fração F2). Esta modificação química produziu novos polímeros com um alto caráter iônico devido ao aumento do teor de grupos carboxila e da presença natural de grupos sulfato.

As ulvanas policarboxílicas obtidas apresentaram maior atividade anticoagulante *in vitro* pelo teste do APTT quando comparado com as ulvanas nativas. A atividade anticoagulante destes novos produtos foi atribuída ao aumento no teor dos grupos carboxila em conjunto com a presença dos grupos sulfato. Além disso, estes polímeros apresentaram M_w até 6,9 vezes menor quando comparado com o polímero nativo, sendo esta uma característica importante na projeção de novas moléculas bioativas para a atividade anticoagulante.

As ulvanas nativas e modificadas quimicamente não apresentaram atividade pelos testes de PT e TT. Este dado sugere que o principal mecanismo envolvendo a atividade anticoagulante das ulvanas nativas e modificadas via oxidação periodato-clorito ocorre via ação na via intrínseca da cascata de coagulação.

As análises de titulação condutimétrica e de RMN na presença de cálcio demonstraram que as ulvanas nativas (Fração F2) apresentam afinidade com os íons Na^+ e Ca^{2+} quando em solução, a qual aumenta após a oxidação periodato-clorito (fração C3). Esta afinidade foi atribuída à interação destes íons com os grupos carboxilas gerados.

Portanto, a modificação química realizada no presente trabalho originou polímeros inéditos e com potencial aplicação na terapia anticoagulante.

REFERÊNCIAS

A guide to the seaweed industry Disponível em <<http://www.fao.org/3/a-y4765e.pdf>> Acesso em 02/03/2017.

ADRIEN, A.; BONNET A.; DUFOUR D.; BAUDOUIN, S.; MAUGARD, T.; BRIDIAU, N. Pilot production of ulvans from *Ulva* sp. and their effects on hyaluronan and collagen production in cultured dermal fibroblasts. **Carbohydr. Polym.**, v. 157, p. 1306 - 1314, 2017.

AGARWAL, A.; DANISHEFSKY, I. Requirement of free carboxyl groups for the anticoagulant activity of heparin. **Thromb. Res.**, v.42, p.673 - 680, 1986.

ALEKSEEVA, A.; CASU, B.; CASSINELLI, G.; GUERRINI, M.; TORRI, G.; NAGGI, A. Structural features of glycol-split low-molecular-weight heparins and their heparin lyase generated fragments. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 406, p. 249–265, 2014.

ALIPOUR H.J.; REZAEI, M.; SHABANPOUR, B.; TABARSA, M. Effects of sulfated polysaccharides from green alga *Ulva intestinalis* on physicochemical properties and microstructure of silver carp surimi. **Food Hydrocoll.**, v. 74, p. 87 - 96, 2018.

ALVES, A.; PINHO, E.D.; NEVES, N.M.; SOUSA, R.A.; REIS R.L. Processing ulvan into 2D structures: Cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications. **Int. J. of Pharm.**, v. 426, p. 76 – 81, 2012.

ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. *In Vitro* Cytotoxicity Assessment of Ulvan, a Polysaccharide Extracted from Green Algae. **Phytother. Res.**, v. 27, p. 1143 – 1148, 2013.

ANDERSON, M. A.; STONE, B. A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, v. 5, p. 115 - 129, 1985.

ANDRESEN, I. L.; PAINTER, T.; SMIDSRØD, O. Concerning the effect of periodate oxidation upon the intrinsic viscosity of alginate. **Carbohydr. Res.**, v. 59, p. 565-566, 1977.

ARAÚJO, C. A.; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T. R.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydr. Polym.**, v. 91, p. 483 – 491. 2013.

AYOTTE L.; PERLIN, A. S. N.m.r. spectroscopic observations related to the function of sulfate groups in heparin. Calcium binding vs. biological activity. **Carbohydr. Res.**, v. 145, p. 261 - 277, 1986.

BRADING, J. W. E.; GEORG-PLANT, M. M. T.; HARDY, D. M. The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. **J. Chem. Soc.**, p. 319 - 324, 1954.

BeMILLER, J. N. Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 22, p. 25 - 108, 1967.

BENHAMOU, K.; DUFRESNE, A.; MAGNIN, A.; MORTHA, G.; KADDAMI, H. Control of size and viscoelastic properties of nanofibrillated cellulose from palm tree by varying the TEMPO-mediated oxidation time. **Carbohydr. Polym.**, v. 99, p.74 – 83, 2014.

BOZZINI C. E.; MOLINAS F. Hemostasia. In: Houssay, A.B.; Cirigolani, H.E. Fisiologia Humana de Houssay, 7 ed. Artmed, Porto Alegre. 2004.

BULIGA, G. S.; BRANT, D. A. Temperature and molecular weight dependence of the unperturbed dimensions of aqueous pullulan. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 9, p. 71 - 76, 1987.

CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. **Acta Veterinaria Brasileira**, v.1, n.2, p.49 - 55, 2007

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CERESO, A. S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, p. 20, 97 - 105, 1997.

CARRAGEENAN INDUSTRY REPORT 2012. CyberColloids Ltd., 2014. Disponível em <<http://www.cybercolloids.net/sites/default/files/private/downloads/Carrageenan%20market%20report%202012%20contents.pdf>> Acesso em 02/03/2017.

CASTRO, R.; PIAZZON, M. C.; ZARRA, I.; LEIRO, J.; NOYA, M.; LAMAS, J. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. **Aquacult.**, v. 254, p. 9 – 20, 2006.

CASU, B.; GENNARO, U.; MEILLE, S. V.; MORRONE, M.; NAGGI, A.; OCCHIPINTI, M.S.; TORRI, G. Dicarboxyamylose and dicarboxycellulose, stereoregular polyelectrolytes: physicochemical characterization and interaction with divalent cations **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 6, p. 89 - 92, 1984.

CASU, B.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; PEREZ, M.; TORRI, G.; RIBATTI, D.; CARMINATI, P.; GIANNINI, G.; PENCO, P.; PISANO, C.; BELLERI, M.; RUSNATI, M.; PRESTA, M. Short Heparin Sequences Spaced by Glycol-Split Uronate Residues Are Antagonists of Fibroblast Growth Factor 2 and Angiogenesis Inhibitors. **Biochem.**, v. 41, p. 10519 - 10528, 2002.

CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Re-visiting the structure of heparin. **Carbohydr Res.**, v. 403 p. 60 - 68, 2015.

CAUGHEY, G. H. Building a better heparin. **Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 28 (2), p. 129 - 132, 2003.

CHAIDEDGUMJORN, A.; TOYODA, H.; WOO, E. R.; LEE, K. B.; KIM, Y. S.; TOIDA, T.; IMANARI, T. Effect of (1→3)- and (1→4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 925 - 933. 2002.

CHO, M. L.; LEE, B.; YOU, S. Relationship between Oversulfation and Conformation of Low and High Molecular Weight Fucoidans and Evaluation of Their in Vitro Anticancer Activity. **Molecules**, v.16, p. 291 - 297, 2011.

CHRISTENSEN, B. E.; VOLD, I. M. N.; VÅRUM, K. M. Chain stiffness and extension of chitosans and periodate oxidised chitosans studied by size-exclusion chromatography combined with light scattering and viscosity detectors. **Carbohydr. Polym.**, v. 74, p. 559 - 565, 2008.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CERESO, A. S. Overview of Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides from Seaweeds in Relation to their Structures, Focusing on those of Green Seaweeds. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, p. 2503 - 2529, 2010.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. Organic Chemistry. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.

COHEN, M. The role of low-molecular-weight heparins in arterial diseases: optimizing antithrombotic therapy. **Thromb. Res.**, v. 100, p. 131 - 139, 2000.

COLLINS, P.; FERRIER, R. Reactions and products of reactions at the anomeric centre. In: _____. (Ed.) Monosaccharides: the chemistry and their roles in natural products. Wiley, New York, p. 60 - 188, 1995.

COLMAN, R. W. Are haemostasis and thrombosis two sides of the same coin? **J.Exp. Med.**, v. 203, p. 493 - 495, 2006.

COLODI, F. G. ULVANAS MODIFICADAS VIA AMIDAÇÃO E AMINAÇÃO REDUTIVA: SEMISSÍNTESE DE HÍBRIDOS ULVANA-KAPPA-CARRABIOSE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS. 218f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

- DALCANELE, E.; MONTANARI, F. Selective Oxidation of Aldehydes to Carboxylic Acids with Sodium Chlorite-Hydrogen Peroxide. **J. Org. Chem.**, v. 51, p. 567 - 569, 1986.
- DALHEIM, M. Ø.; VANACKER, J.; NAJMI, M. A.; AACHMANN, F. L.; STRAND, B. L.; CHRISTENSEN, B. E. Efficient functionalization of alginate biomaterials. **Biomaterials**, v. 80, p. 146 - 156, 2016.
- DAMONTE E. B.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 2399 - 2419, 2004.
- DE KORT, M.; BUIJSMAN, R. C.; VAN BOECKEL, C. A. A. Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs. **Drug Discov. Today**, v. 10, p. 769 - 779, 2005.
- DAVIE E. W.; RATNOFF O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p.1310 - 1312, 1964.
- DEVLIN, T. M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. São Paulo: Ed. Blücher, 2007.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. **Biochem. J.**, v. 84, p. 106 - 110, 1962.
- DRAKE T. A.; MORRISSEY J. H.; EDGINGTON T. S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of hemostasis and thrombosis. **Am J Pathol.**, v.134, p.1087 - 1097, 1989.
- DUARTE, M. E. R.; GORIN, P. A. J.; DUARTE, J. H. Homogeneous glucuronic and mannuronic acid blocks in the alginate of the brown seaweed *Lamznaria brasiliensis*. **Phytochem.**, v. 30, p.1707 - 1708, 1991.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350 - 356, 1956.
- FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157 - 162, 1991.
- FLOOR, M.; PETERS, J. A.; BEKKUM, H.; KIEBOOM, A. P. G.; KOEK, J. H.; SMEETS, F. L. M.; NIEMANTSVERDIET, R. B. Structural and conformational effects on the complexation of calcium by 2,3-dicarboxy derivatives of B-cyclodextrin (cyclomaltoheptaose), amylose, and cellulose. **Carbohydr. Res.**, v. 203, p.19 - 32. 1990.
- FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. Ithaca, NY: Cornell, University Press, 1953.
- FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Simpósio: **HEMOSTASIA E TROMBOSE**. Medicina, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229 - 237, jul./dez. 2001.
- FRANSON, L. Periodate oxidation of L-iduronic acid residues in dermatan sulphate. **Carbohydr. Res.**, v. 36, p. 339 - 348, 1974.
- FREITAS, M. B.; FERREIRA, L. G.; HAWERROTH, C.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; STADNIK, M. J. Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulphatation degree. **Carbohydr. Polymers**, 133, 384 – 390, 2015.
- FORSBERG, L. S.; PAZUR, J. H. The characterization of hemiacetal bonds formed periodate oxidation of heteroglycans. **Carbohydr. Res.**, v. 75 , p. 129 - 140, 1979.
- GADENNE, V.; LEBRUN, L.; JOUENNE, T.; THEBAULT, P. Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surfasse. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 112, p. 229 – 236, 2013.
- GIACOMELLI, F. **Tópicos em nanociência e nanotecnologia**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, v. 1, p. 93-106, 2008.

- GOLDSTEIN, I. J.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods Carbohydr. Chem.**, Academic Press, New York, v. 5, p. 361 - 369, 1965.
- GOMEZ, G.; RINAUDO, M.; VILLAR, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. **Carbohydr. Polym.**, v. 67, p. 296 – 304, 2007.
- GORAD, M.; DÉCORDÉ, K.; VENTURA, E.; SOTERAS, G.; BACCOU, J. C. Polysaccharides from the green alga *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent fatty streak lesions in the high cholesterol fed hamster, an animal model of nutritionally-induced atherosclerosis. **Food Chem.**, v. 115, p. 176 – 180, 2009.
- GRANT, D.; LONG, W. F.; WILLIAMSON, F. B. A potentiometric titration study of the interaction of heparin with metal cations. **Biochem. J.**, v. 285, p. 477 - 480, 1992.
- GREINACHER, A.; WARKENTIN, T. E. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: review and update. **Thromb. Res.**, v. 118, p.165 - 176, 2006.
- GUIRY, M.D. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. Acesso em 25/09/2017.
- GUTZ, I. G. R., programa CurTiPot - pH e Curvas de Titulação Potenciométrica: Análise e Simulação, versão 4.2, <http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot.html> 1992 - 2017.
- HAUG, A. The Influence of Borate and Calcium on the Gel Formation of a Sulfated Polysaccharide from *Ulva lactuca*. **Acta Chem. Scand. B**, v.30, p. 562 - 566, 1976.
- ISHAK, M. F.; PAINTER T. J. Kinetic evidence for hemiacetal formation during the oxidation of dextran in aqueous periodate. **Carbohydr. Res.**, v. 64, p. 189 - 197, 1978.
- ISOM, D. G.; CASTAÑEDA, C. A.; CANNON, B. R.; GARCÍA-MORENO, B. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *PNAS*, v. 108, n. 13, p. 5260 – 5265, 2011.
- JANSSON, P. E.; KENNE, L.; WIDMALM, G. Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ¹H- and ¹³C-N.M.R. data. **Carbohydr. Res.**, v. 188, p. 169 - 191, 1989.
- JING, Z. W.; MA, Z. W.; LI, C.; JIA, Y. Y.; LUO, M.; MA, X. X.; ZHOU, S. Y.; ZHANG, B. L. Chitosan cross-linked with poly(ethylene glycol)dialdehyde via reductive amination as effective controlled release carriers for oral protein drug delivery. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 27, p. 1003 - 1006, 2016.
- JOST, R.; MIRON, T.; WILCHEK, M. The mode of adsorption of proteins to aliphatic and aromatic amines coupled to cyanogen bromide-activated agarose. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 362, p. 75 - 82, 1974.
- KANG, H. A.; SHIN, M. S.; YANG, J. W. Preparation and characterization of hydrophobically modified alginate. **Polymer Bulletin**, v. 47, p. 429 – 435, 2002.
- KIM, U-J.; KUGA, S. Ion-exchange chromatography by dicarboxyl cellulose gel. **J. Chromatogr. A**, v. 919, p. 29 – 37, 2001.
- KONG, H. J.; KAIGLER, D.; MOONEY, D. J. Controlling rigidity and degradation of alginate hydrogels via molecular weight distribution. **Biomacromol.**, v. 5, p. 1720 – 1727, 2004.
- KRISTIANSEN, K. A.; POTTHAST, A.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydr. Res.**, v. 345, p. 1264 – 1271, 2010.
- LAHAYE, M. NMR. spectroscopic characterization of oligosaccharides from two *Ulva rigida* samples (*Ulva* spp., Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydr. Res.**, v. 314, p. 1 - 12, 1998.
- LAHAYE, M.; AXELOS, M. A. V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.). **Carbohydr. Polym.**, v. 22, p. 261 - 265, 1993.

- LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 304, p. 325 - 333, 1997.
- LAHAYE, M.; CIMADEVILLA, E. A.-C.; KUHLENKAMP, R.; QUEMENER, B.; LOGNONÉ, V.; DION, P. Chemical composition and ^{13}C NMR spectroscopic characterization of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). **J. Appl. Phycol.**, v.11, p. 1 - 7, 1999.
- LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUROUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. **Carbohydr. Polym.**, v. 36, p 239-249, 1998.
- LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 283, p. 161 - 173, 1996.
- LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweed. **Biomacromol.**, v. 8, p. 1765 - 1774, 2007.
- LARSEN, B.; PAINTER, T. J. The periodate-oxidation limit of alginate. **Carbohydr. Res.**, v. 10, p. 186 - 187, 1969
- LAVAZZA, M.; FORMANTICI, C.; LANGELLA, V.; MONTI, D.; PFEIFFER, U.; GALANTE, Y. M. Oxidation of galactomannan by laccase plus TEMPO yields an elastic gel. **J. of Biotechnology**, v. 156, p. 108 – 116, 2011.
- LEIRO, J. M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J. A.; LAMAS J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 879 - 888, 2007.
- LI, N.; LIU, X.; HE, X.; WANG, S.; CAO, S.; XIA, Z. XIAN, H.; WEN, L.; MAO, J. Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. **Carbohydr. Polym.**, v. 159, p. 195 - 206, 2017.
- LIIMATAINEN, H., VISANKO, M., SIRVIÖ, J. A., HORMI, O. E. O.; NIINIMAKI, J. Enhancement of the Nanofibrillation of Wood Cellulose through Sequential Periodate–Chlorite Oxidation. **Biomacromol.**, v. 13, p. 1592 – 1597, 2012.
- LINDAHL, U.; AXELSSON, O. Identification of Iduronic Acid as the Major Sulfated Uronic Acid of Heparin. **The J. of Biological Chem.**, v. 246, p. 74 - 82, 1971.
- LINDGREN, B. O.; NILSSON, T. Preparation of carboxylic acids from aldehydes (including hydroxylated benzaldehydes) by oxidation with chlorite. **Acta chemical Scandinavica**. v. 27, p. 888 - 890, 1973.
- LIU, H.; ZHANG, Z.; LINHARDT, R. J. Lessons learned from the contamination of heparin. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 313 – 321, 2009.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J. FARR, A. L.; RANDALL, K. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265 - 275, 1951.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2001.
- MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.
- MAEDA, M.; UEHARA, T.; HARADA, N.; SEKIGUCHI, M.; HIRAOA, A. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the Chlorophyta. **Phytochem.**, v. 30, p. 3611 - 3614, 1991.
- MAIA, J.; CARVALHO, R. A.; COELHO, J. F. J.; SIMÕES, P. N.; GIL, M. H. Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes. **Polymer**, v. 52, p. 258 - 265, 2011.

- MAO, W.-J.; FANG, F.; LI, H.-Y.; QI, X.-H.; SUN, H.-H.; CHEN, Y.; GUOU, S.-D. Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*. **Carbohydr. Pol.**, v. 74, p. 834 - 839, 2008.
- MAO, W.; ZANG, X.; LI, Y.; ZHANG, H. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva globata* and their anticoagulant activity. **J. of App. Phycol.**, v. 18, p. 9 - 14, 2006.
- MAZÁK, K.; BEECHER, C. N.; KRASZNI, M.; LARIVE, C. K. The interaction of enoxaparin and fondaparinux with calcium. **Carbohydr. Res.**, v. 384, p. 13-19, 2014.
- MAZEN, F.; MILAS, M.; RINAUD, M. Conformational transition of native and modified gellan. **Int. J. of Biolog. Macromol.**, v.26, p.109 -118, 1999.
- MENAJOVSKY, L. B. Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management strategies. **Amer. J. Med.**, v. 118 (8), p. 21 - 30, 2005.
- MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46 n. 3, p. 267 - 273, 2010.
- MORELLI, A.; BETTI, M.; PUPPI, D.; CHIELLINI, F. Design, preparation and characterization of ulvan based thermosensitive hydrogels. **Carbohydr. Polym.**, v. 136, p. 1108 - 1117, 2016.
- MORRIS, E. R.; REES, D. A.; WELSH, E. J.; DUNFIELD, L. G.; WHITTINGTON, S. G. Relation between primary structure and chain flexibility of random coil polysaccharides: Calculation and experiment for a range of model carrageenans. **J. Chem. Soc. Perkin II**, p. 793 - 800, 1978.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M.-C.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a Fucosylated Chondroitin sulfate from Echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. **J. Biol. Chem.**, v., 271, p. 23976-84, 1996.
- NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.**, v. 86, p. 1323 - 1327, 1979.
- NASATTO, P. L.; PIGNON, F.; SILVEIRA, J. L. M.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; RINAUDO, M. Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications. **Polymers** v. 7, p. 777 - 803, 2015.
- NISHIMURA S. I.; NISHI, N.; TOKURA, S.; OKIEI, W.; SOMORIN, O. Inhibition of the hydrolytic activity of thrombin by chitin heparinoids. **Carbohydr. Res.**, v.156, p. 286 - 292, 1986.
- NISHINO, T.; NAGUMO, T.; KIOHARA, H.; YAMADA, H. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydr. Res.**, v. 211, 77 - 90, 1991.
- NISHINO, T.; TAKABE, Y.; NAGUMO, T. Isolation and partial characterization of a novel β -D-galactan sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* var. *longissima*. **Carbohydr. Polym.**, v. 23, 165 - 73, 1994.
- OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; AMÂNCIO, C. E.; SANT'ANNA, C. L. Algas e angiospermas marinhas bêmicas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. 1999. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/brnd/round6/guias/PERFURACAO/PERFURACAO_R6/refere/plantas_marinh as.pdf> Acesso em 12/09/2011.
- PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*). **Pharmacolog. Res.**, v. 48, p. 543 - 549, 2008.
- PAINTER, T.; LARSEN, B. Formation of hemiacetals between neighbouring hexuronic acid residues during the periodate oxidation of alginate. **Acta Chem. Scand.**, v. 24, p. 813 - 833, 1970.

- PAINTER, T.; LARSEN, B. Transient hemiacetal structures formed during the periodate oxidation of xylan. **Acta Chem. Scand.**, v. 24, p. 2366 – 2378, 1970b.
- PAINTER, T.; LARSEN, B. Kinetic evidence for inter-residue hemiacetal formation during the oxidation of amylose by periodate ion. **Acta Chem. Scand.**, v. 24, p. 2724-2736, 1970c.
- PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; CHIESSI, E. A Conformational Study on the Algal Polysaccharide Ulvan. **Macromol.**, v. 35, p. 6404 - 6411, 2002.
- PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; PIZZOFERRATO, L.; LIQUORI, A. M. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. **Int. J. of Biological Macromol.**, v. 25, p. 309 – 315, 1999.
- PAPY-GARCIA, D.; BARBIER-CHASSEFIÈRE, V.; ROUET, V.; KERROS, M.; KLOCHENDLER, C.; TOURNAIRE, M.; BARRTAULT, D.; CARUELLE, J.; PETIT, E. Nondegradative Sulfation of polysaccharides. syntheses and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. **Macromol.**, v. 38, p. 4647 - 4654, 2005.
- PATEL, S.; BERRY, L. R.; CHAN, A. K. C. Covalent antithrombin-heparin complexes. **Thromb. Res.**, v. 120, p.151 - 160, 2007.
- PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmac. Res.**, v. 48, p. 543 - 549, 2003b.
- PERCIVAL, E; WOLD, J. K. The acid polysaccharides from the green seaweed *Ulva lactuca*. Part II. The site of the ester sulphate. **J. Chem. Soc.**, p. 5459 - 5468, 1963.
- PERLIN; A. S. Glycol-cleavage oxidation. **Adv. Carbohydr. chem. biochem.**, v. 60, p. 183 - 250, 2006.
- PETIT, E.; PAPY-GARCIA, D.; MULLER, G.; COURTOIS, B.; CARUELLE, J-P.; COURTOIS, J. Controlled sulfation of natural anionic bacterial polysaccharides can yield agents with specific regenerating activity *in vivo*. **Biomacromol.**, v. 5, p. 445 - 452, 2004.
- PETITOU, M.; CASU, B.; LINDAHL, U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. **Biochimie**, v. 85, p. 83 - 89, 2003.
- PICOUT, D. R.; ROSS-MURPHY, S. B. On the Mark–Houwink parameters for galactomannans. **Carbohydr. Polym.**, v. 70, p. 145 – 148, 2007.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, p. 1016–1027, 2008.
- QI, H.; HUANG, L.; LIU, X.; LIU, D.; ZHANG, Q.; LIU, S. Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Carbohydr. Polym.**, v. 87, p.1637 – 1640, 2012.
- QI, H.; LIU, X.; WANG, K.; LIU, D.; HUANG, L.; LIU, S.; ZHANG, Q. Subchronic toxicity study of ulvan from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in Wistar rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 62, p. 573 – 578, 2013.
- QUEMENER, B.; LAHAYE, M.; BOBIN-DUBIGEON, C. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. **J. Appl. Phycol.**, v. 9, p. 179 - 188, 1997.
- RABENSTEIN, D. L.; ROBERT, J. M.; PENG, J. Multinuclear magnetic resonance studies of the interaction of inorganic cations with heparin. **Carbohydr. Res.**, v. 278, p. 239 - 256, 1995.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 344-366, 2001.

REDOUAN, E.; EMMANUEL, P.; MICHELLE, P.; BERNARD, C.; JOSIANE, C.; CÉDRIC, D. Evaluation of antioxidant capacity of ulvan-like polymer obtained by regioselective oxidation of gellan exopolysaccharide. **Food Chem.**, v. 127, p. 976 – 983, 2011.

REED, W. F. Data evaluation for unified multi-detector size exclusion chromatography — molar mass, viscosity and radius of gyration distributions **Macromol. Chem. Phys.**, p. 1539-1575, v. 196, 1995.

REED, C. E.; REED, W. F. Monte Carlo electrostatic persistence lengths compared with experiment and theory **J. Chem. Phys.**, p. 8479, v. 94, 1991.

ROBIC, A.; GAILLARD, C. SASSI, J.F.; LERAT, Y.; LAHAYE, M. Ultrastructure of Ulvan: A Polysaccharide from Green Seaweeds. **Biopolymers**, v. 91; p. 652-664, 2009.

SANTOS, G. C. Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagent TEMPO e o ácido tricloroisocianurônico como co-oxidante. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SCHLESINGER, M.; SCHMITZ, P.; ZEISIG, R.; NAGGI, A.; TORRI, G.; CASU, B.; BENDAS, G. The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives. **Thrombos. Res.**, v. 129, p. 603 – 610, 2012.

SENCHENKOVA, S. N.; SHASHKOV, A. S.; LAUX, P.; KNIREL, Y.; RUDOLPH, K. The O-chain polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. Begonia GSPB 525 is a partially L-xylosylated L-rhamnan. **Carbohydr. Res.**, v. 319, p. 148 -153, 1999.

SHAO, P.; MA, H.; ZHU, J.; QIU, Q. Impact of ionic strength on physicochemical stability of o/w emulsions stabilized by *Ulva fasciata* polysaccharide. **Food Hydrocol.**, v. 69, 202 - 209, 2017.

SHAO, P.; PEI, Y.; FANG, Z.; SUN, P. Effects of partial desulfation on antioxidant and inhibition of DLD cancer cell of *Ulva fasciata* polysaccharide. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 65, p. 307 – 313, 2014.

SHI, Y.; XU, D.; LIU, M.; FU, L.; WAN, Q.; MAO, L.; DAI, D.; WEN, Y.; ZHANG, Z.; WEI, Y. Room temperature preparation of fluorescent starch nanoparticles from starch-dopamine conjugates and their biological applications. **Mater. Sci. Eng., C**, v. 82, p. 204 - 209, 2018.

SILVERTEIN R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE; D. Spectrometric identification of organic compound. 7^a ed. New York : John Wiley and Sons, 2005.

SIRVIÖ, J. A.; LIIMATAINEN, H.; VISANKO, M.; NIINIMÄKI, J. Optimization of dicarboxylic acid cellulose synthesis: Reactionstoichiometry and role of hypochlorite scavengers. **Carbohydr. Pol.**, v. 114, p. 73-77, 2014.

STEVENS, R. V.; CHAPMAN, K. T.; WELLER, H. N. Convenient and inexpensive procedure for oxidation of secondary alcohols to ketones. **J. Org. Chem.**, v. 45, p. 2030 – 2032, 1980.

TANG, C. T.; SHENG, K. V. C.; POUNIOTIS, D.; ESPARON, S.; SON, H.Y.; KIM, C. H.; PIETERSZ, G. A.; APOSTOLOPOULOS, V. Oxidized and reduced mannan mediated MUC1 DNA immunization induce effective anti-tumor responses. **Vaccine**, v. 26, p. 3827 – 3834, 2008.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuranans to monossaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochem.**, v. 11, p. 1383 - 1388, 1972.

THANH T. T.; QUACH, T.M.; NGUYEN T. N.; VU LUONG D.; BUI M. L.;TRAN, T. T. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 93, p. 695 - 702, 2016.

TOSKAS, G.; HEINEMANN, S.; HEINEMANN, C.; CHERIFA, C.; HUNDA, R.-D.; ROUSSIS, V.; HANKE, T. Ulvan and ulvan/chitosan polyelectrolyte nanofibrous membranes as a potential substrate material for the cultivation of osteoblasts. **Carbohydr. Polym.**, v. 89, p. 997 – 1002, 2012.

- TOSKAS, G.; HUND, R. D.; LAOURINE, E.; CHERIF, C.; SMYRNIOTOPOULOS, V.; ROUSSIS, V. Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva Rigida*. **Carbohydr. Pol.**, v. 84, p. 1093 – 1102, 2011.
- URRY, F. W.; COWDA, D. C.; PENC, S.; PARKER, T. M.; JINC, N.; HARRIS, R. D. Nanometric Design of Extraordinary Hydrophobic-Induced pKa Shifts for Aspartic Acid: Relevance to Protein Mechanisms. **Biopolymers**, v. 34, p. 889 - 8963, 1994.
- USOV, A. I. NMR Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides: Agars, Carrageenans, and Xylans. **Botanica Marina**, v. 27, p. 189 - 202, 1984.
- VARMA, J.; CHAVAN, V. B. A study of crystallinity changes in oxidized Celluloses. **Polymer Degradation and Stability**, v.49, p. 245 - 250, 1995.
- VEELAERT, S.; DEWIT, D.; GOTLIEB, K. F.; VERHE, R. The gelation of dialdehyde starch. **Carbohydr. Polym.**, v. 32, p. 131 - 139, 1997.
- VERRASTRO T. Hemostasia. In: Aires M.M. Fisiologia, 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, v. 27, p. 139 - 145, 2004.
- VOLD, I. M. N.; KRISTIANSEN, K. A.; CHRISTENSEN, B. E. Study of the Chain Stiffness and Extension of Alginates, *in Vitro* Epimerized Alginates, and Periodate-Oxidized Alginates Using Size-Exclusion Chromatography Combined with Light Scattering and Viscosity Detectors. **Biomacromol.**, v. 7, p. 2136 - 2146, 2006.
- VU-QUANG, H.; MUTHIAH, M.; KIM, Y.; CHO, C.; NAMGUNG, R.; KIM, W. J.; RHEE, J. H.; KANG, S. H.; JUN, S. Y.; CHOI, Y.; JEONG, Y. Y.; PARK, I. Carboxylic mannan-coated iron oxide nanoparticles targeted to immune cells for lymph node-specific MRI *in vivo*. **Carbohydr. Polym.**, v. 88, p. 780 - 788, 2012.
- WANG, X.; ZHANG, Z.; YAO, Z.; ZHAO, M.; QI, H. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. **Int. J. of Biolog. Macromol.**, v. 58, p. 225 – 230, 2013.
- WEI, B.; LI, H.; TIAN, Y.; XU, X.; JIN, Z. Thermal degradation behavior of hypochlorite-oxidized starchnanocrystals under different oxidized levels. **Carbohydr. Polym.**, v.124, p.124 – 130, 2015.
- WICHA, J.; ZARECKI, A. Oxidation with chlorine complexes. Specific oxidation of secondary hydroxyl groups in the presence of primary hydroxyl groups in polyhydric alcohols. **Tetrahedron Letters**, v.15, p. 3059 - 3062, 1974.
- YOUNG, R. J.; LOVELL, P. A. **Introduction to polymers**. Kingstonon-Thames, UK:Nelson Thomes Ltda, 1991.
- ZHANG, H.-J.; MAO, W.-J.; FANG, F.; LI, H.-Y.; SUN, H.-H.; CHEN, Y.; QUI, X.-H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 71, p. 428 - 434, 2008.
- ZHANG, L.; ZHANG, X.; ZHOU, Q.; ZHANG, P.; ZHANG, M.; LI, X. Triple Helix of β -D-Glucan from *Lentinus Edodes* in 0.5 M NaCl Aqueous Solution Characterized by Light Scattering. **Polym. J.**, v. 33, p. 317 - 321, 2001.